

## Dissertation

**Die Wirkung von systemisch appliziertem rekombinantem speziesspezifischem  
Wachstumshormon auf den Knochenumbau am Achsenskelett.  
Histologische und histomorphometrische Untersuchungen bei der  
Distraktionsosteogenese am Yucatan-Minischwein.**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Julia Funk  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

Gutachter: 1. PD Dr. med. C. Perka  
2. Prof. Dr. med. M. J. Raschke  
3. Prof. Dr. med. R. Gradinger

Datum der Promotion: 11. Oktober 2004

---

Abstrakt	VI
Abstract	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	X
1 Stand des Wissens	1
1.1 Anatomie, Physiologie und Biologie des Knochens	1
1.1.1 Funktion des Knochens	1
1.1.2 Biologie des Knochens	1
1.1.2.1 Zellen	1
1.1.2.2 Matrix	3
1.1.3 Umbau des Knochens	7
1.1.3.1 Origination und Aktivierung	8
1.1.3.2 Resorption	8
1.1.3.3 Formation und Mineralisation	9
1.1.3.4 Kopplung	10
1.1.4 Anatomie des Knochens	10
1.1.4.1 Kortikaler Knochen	10
1.1.4.2 Spongioser Knochen	11
1.1.5 Vergleich des Knochens von Mensch und Schwein	12
1.1.6 Systemische Auswirkungen von Skelettverletzungen	12
1.1.7 Distraktionsosteogenese	13
1.2 Wachstumshormon	14
1.2.1 Struktur und Bildung	14
1.2.1.1 Ort der Bildung	14
1.2.1.2 Aufbau	15
1.2.2 Hypothalamus-Hypophysen-Achse	15
1.2.2.1 Steuerung der Sekretion	16

	Inhalt
1.2.2.2 Freisetzung und Ausscheidung	16
1.2.3 Wirkmechanismen	16
1.2.3.1 Somatomedin- und duale Effektortheorie	17
1.2.3.2 Direkte Wirkung von Wachstumshormon	17
1.2.3.3 IGF-vermittelte Wirkung von Wachstumshormon	18
1.2.3.4 Rückkopplungsmechanismus	19
1.2.4 Interaktion mit Stoffwechselmechanismen	19
1.2.4.1 Zuckerstoffwechsel	19
1.2.4.2 Fettstoffwechsel	20
1.2.4.3 Eiweißstoffwechsel	20
1.2.4.4 Calciumstoffwechsel	20
1.2.5 Herstellung und Verfügbarkeit	20
1.2.6 Anwendung in der Medizin	21
1.2.6.1 Klinische Anwendung	21
1.2.6.2 Experimentelle Anwendung	21
1.2.6.3 Wund- und Frakturheilung	21
1.2.6.4 Missbrauch und unerwünschte Wirkung	22
1.3 Interaktion von Wachstumshormon und Knochen	23
1.3.1 Wirkung auf die verschiedenen Zellen	23
1.3.1.1 Osteoblasten	23
1.3.1.2 Osteoklasten	24
1.3.2 Wirkung auf den Umbau	24
1.3.3 Unterschiedliche Einflüsse von GH und IGF	25
1.3.4 Hypophysärer Gigantismus und Akromegalie	26
1.3.5 Bisherige Studien	27
1.4 Polychrome Sequenzmarkierung	28
1.5 Herleitung der Fragestellung	31
2 Untersuchungsgut und Methoden	32
2.1 Versuchstiere	32
2.1.1 Haltung und Nahrung	33
2.1.2 Gruppeneinteilung	34

	Inhalt
2.1.3	Operation 35
2.1.3.1	Portimplantation 35
2.1.3.2	Fixateuroperation 35
2.1.4	Postoperative Behandlung und Untersuchung 36
2.1.4.1	Applikation von Wachstumshormon/Placebo 36
2.1.4.2	Distraktion 36
2.1.4.3	Schmerzprophylaxe 37
2.1.4.4	Temperatur, Gewicht 37
2.1.4.5	Blutentnahme 37
2.1.4.6	Röntgen, Ultraschall, Steifigkeitsmessung 37
2.1.4.7	Polychrome Fluoreszenzmarkierung 38
2.1.5	Tötung und Sektion 38
2.2	Histologische Untersuchungen 39
2.2.1	Fixierung und Lagerung 40
2.2.2	Sägen 40
2.2.2.1	Rippen 40
2.2.2.2	Wirbel 41
2.2.2.3	Beckenkamm 42
2.2.3	Entwässerung und Infiltration 43
2.2.4	Polymerisation 44
2.2.5	Herstellung von Schliffen 45
2.2.6	Herstellung von Schnitten 46
2.2.7	Färbungen 46
2.2.7.1	Versilberung nach Von-Kossa 47
2.2.7.2	Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner 48
2.3	Auswertung 50
2.3.1	Bildanalysesystem 50
2.3.2	Histologische Beobachtungen 51
2.3.3	Statische Histomorphometrie 52
2.3.3.1	Mikrostruktur des kortikalen und spongiösen Knochens 52
2.3.3.2	Umfangsparameter für Knochenresorption und -formation 59
2.3.4	Dynamische Histomorphometrie 61

	Inhalt
2.3.4.1 Mineralappositionsrates am kortikalen Knochen	61
2.3.4.2 Mineralappositionsrates am spongiösen Knochen	65
2.3.5 Statistische Analysen	66
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>68</b>
3.1 Histologische Beobachtungen	68
3.2 Statische Parameter	68
3.2.1 Knochenmikrostruktur	68
3.2.2 Remodellierungsparameter	86
3.3 Dynamische Parameter	94
<b>4 Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1 Diskussion der Methoden	97
4.1.1 Studiendesign	97
4.1.2 Histologische Verfahren	98
4.1.3 Histomorphometrie und Bildanalyse	99
4.2 Diskussion der Ergebnisse	101
4.2.1 Knochenmikrostruktur	101
4.2.2 Remodellierungsparameter	103
4.2.3 Mineralappositionsrates	104
4.3 Vergleich mit anderen Studien	105
4.3.1 Tierexperimentelle Studien	105
4.3.2 Untersuchungen an humanen Präparaten	108
4.3.3 Wirkung von GH auf Knochen	110
4.3.4 Wirkung von Distraction auf Knochen	112
4.4 Schlussfolgerung	114
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>115</b>
<b>Literatur</b>	<b>117</b>

	Inhalt
Anhang	136
Danksagung	160
Lebenslauf	162
Erklärung an Eides Statt	163

---

## Abstrakt

Die Auswirkung der systemischen Applikation von 100µg/kg/KG rekombinantem speziesspezifischem Wachstumshormon (GH) über 26 Tage auf den Knochenumbau des Yucatan-Minischweins wurde an Wirbelkörpern, Beckenkämmen und Rippen histomorphometrisch untersucht. Der Einfluss der Distraktionsosteogenese auf die Mineralappositionsrate wurde ermittelt.

24 Tiere wurden an der linken Tibia osteotomiert, ein Fixateur externe wurde zur Distraktionsosteogenese von 2mm/d angelegt. 12 Tiere erhielten Wachstumshormon, 12 Placebo. Eine polychrome Fluoreszenzmarkierung wurde i.v. appliziert. *Post mortem* wurden Schnitte und Dünnschliffe der genannten Knochen angefertigt. Mittels Bildanalysesystem erfolgte die histomorphometrische Auswertung anhand der Parameter Knochendichte, Porosität, Trabekeldicke, Trabekelumbauparameter und Mineralappositionsrate (MAR).

Signifikante Veränderungen durch Wachstumshormongabe konnten gezeigt werden. Unterschiede zwischen den Lokalisationen traten auf. So war die Knochendichte der GH-Tiere an Wirbelkörpern und Rippen signifikant geringer als in der Placebogruppe, kein signifikanter Unterschied zeigte sich am Beckenkamm. An allen 3 Lokalisationen war in der Wachstumshormongruppe eine signifikant erhöhte kortikale Porosität zu finden. Nur am Wirbelkörper waren die trabekuläre Knochendichte und die Trabekeldicke bei den GH-Tieren signifikant geringer als bei den Kontrolltieren. Die Knochenresorption war in der GH-Gruppe am Beckenkamm signifikant erhöht. Die Formation war bei den GH-Tieren sowohl iliakal als auch vertebral signifikant erhöht. Insgesamt ergab sich damit ein signifikant verminderter Anteil an ruhender Oberfläche bei den GH-Tieren. In ihrer Ausprägung waren diese Parameter zwischen Wirbel und Beckenkamm signifikant verschieden. Die MAR war in der GH-Gruppe signifikant höher als in der Placebogruppe, außerdem war sie während der Distraktionsphase signifikant höher als während der Konsolidierungsphase.

Vergleicht man die Parameter mit Angaben aus der Literatur, kann bestätigt werden, dass die hier verwendeten Messmethoden geeignet sind, und dass das Yucatan-Minischwein ein geeignetes Modell zur Klärung von Fragestellungen der Knochenbiologie auch im Hinblick auf den Vergleich zum Menschen darstellt.

Schlagwörter:

Wachstumshormon, Knochenumbau, Distraktionsosteogenese, Histomorphometrie



---

## Abstract

The effect of systemic application of 100 µg/kg recombinant species specific growth hormone (GH) on the bone remodelling of 24 Yucatan mini pigs for a duration of 26 days was evaluated on vertebral body, iliac crest, and rib. The influence of distraction osteogenesis on the mineral apposition rate (MAR) was examined.

24 animals were osteotomized at the left tibia and treated with an external fixator for distraction osteogenesis of 2 mm/d. 12 of them received GH, the others placebo. A sequential polychrome fluorescent labelling was applied. After sacrifice thin and ground sections were manufactured. Using an image analysis system, a histomorphometrical evaluation was performed by means of bone density, porosity, trabecular thickness, trabecular remodelling parameters, and mineral apposition rate (MAR).

Significant changes after GH application were visible. Differences between the locations were found. The bone density of vertebrae and ribs of the treatment group was significantly lower than that of the placebo group, whereas no difference was seen in the iliac crest biopsies. All 3 locations showed a significantly higher cortical porosity in the GH group. The trabecular bone density and the trabecular thickness were significantly decreased only in the vertebral bodies of the treatment group. The bone resorption was significantly elevated in the iliac crests of the GH group. The bone formation was increased in the iliac crest as well as in the vertebrae of the GH treated animals. Therefore, the resting surface was significantly decreased in the GH group. The extent of these effects was significantly different between iliac crest and vertebral body. The MAR was significantly higher in the GH group and during distraction osteogenesis.

Compared to results of other study groups these parameters validate the methods of measurement and show that the Yucatan mini pig is a suitable model for research concerning bone biology, especially concerning the comparison with human parameters.

Key words:

growth hormone, bone remodelling, distraction osteogenesis, histomorphometry

---

## **Abkürzungsverzeichnis**

A.	Aqua
AP	Alkalische Phosphatase
Ar	Fläche (area)
B	Knochen (bone)
BMU	Multizelluläre Basiseinheit (basic multicellular unit)
BP	Bandpassfilter
BRU	Knochenumbauereinheit (bone remodeling unit)
BSU	Knochenstruktureinheit (bone structural unit)
Ct	Kortikal (cortical)
CT	Calcein-Tetrazyklin (Distraktionsphase)
CX	Calcein-Xylenol (Gesamtzeitraum)
DCAF	2,4-bis-[N,N'-di-(Carboxymethyl)-Aminomethyl]-Fluorescein
Dest.	Destillata (destilliert)
E	Howship'sche Lakunen/Erodiert (eroded)
FFA	Freie Fettsäuren (free fatty acids)
FGF	Fibroblast growth factor
GF	Gesichtsfeld
GH	Wachstumshormon (growth hormone)
GHBP	Wachstumshormonbindungsprotein (GH binding protein)
GHIH	Wachstumshormonhemmungshormon (GH inhibiting hormone)
GHRH	Wachstumshormonfreisetzungshormon (GH releasing hormone)
GS	Gesamtschnitt
h-GH/p-GH	Humanes/porcines Wachstumshormon
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (insulin like growth factor)
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IL	Interleukin
kb	Kilo-Basenpaare
kD	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LP	Langpassfilter
MAR	Mineralappositionsrate (mineral apposition rate)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
O	Osteoid
Ob	Osteoblast (osteoblast)
Oc	Osteoklast (osteoclast)
Pm	Umfang (perimeter)
Q	Ruhend (quiescent)
RAP	Regionales Akzelerationsphänomen
RER	Rauhes endoplasmatisches Retikulum
RKP	Reflexions-Kurzpassfilter
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	Systemisches Akzelerationsphänomen
St.Dev.	Standardabweichung (standard deviation)
T	total
Tb	Trabekulär (trabecular)
TGF	Transforming growth factor
TRAP	Tartrat-resistente-alkalische-Phosphatase
TX	Tetrazyklin-Xylenol (Konsolidierungsphase)
USB	Universal serial bus
Wi	Breite/Dicke (width)

Auf eine Auflistung von international anerkannten Abkürzungen von Maßeinheiten sowie im deutschen Sprachgebrauch allgemein üblichen Abkürzungen wurde hier verzichtet.

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1-1: Zuordnung der Tiere zu den Gruppen (n = 12 je Gruppe).....	34
Tabelle 2.1-2: Alter und Gewicht der Tiere (Median und Spannweiten) .....	34
Tabelle 3.2-1: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Wirbelkörper und Beckenkamm, Gesamtschnittmessung, absolute Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis .....	69
Tabelle 3.2-2: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Rippen, einzeln, Gesamtschnittmessung, absolute Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis .....	71
Tabelle 3.2-3: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Rippen, zusammengefasst, Gesamtschnittmessung, absolute Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis .....	72
Tabelle 3.2-4: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Wirbelkörper und Beckenkamm, Gesamtschnittmessung, prozentuale Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.	74
Tabelle 3.2-5: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Rippen, einzeln, Gesamtschnittmessung, prozentuale Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.	75
Tabelle 3.2-6: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Rippen, einzeln, Gesamtschnittmessung, prozentuale Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.	76
Tabelle 3.2-7: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Wirbelkörper und Beckenkamm, Gesichtsfeldmessung, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis .....	83
Tabelle 3.2-8: Deskriptive Statistik, Gesichtsfeldmessung an Wirbelkörpern und Beckenkämmen, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis .....	86
Tabelle 3.3-1: Deskriptive Statistik, Mineralapposition an Rippendünnschliffen, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis .....	94

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2-1: Wachstumshormon (human) in seiner Struktur (368) .....	14
Abbildung 2.1-1: Yucatan-Minischweine im Stall (111,112,340) .....	34
Abbildung 2.2-1: Knochenbiopsien nach Explantation (von links nach rechts und oben nach unten: Wirbelkörper, Beckenkamm, Rippe) .....	39
Abbildung 2.3-1: Knochenanbau ventral (links) und dorsal an Rippendünnschliffen (rechts)...	51
Abbildung 3.2-1: Gesamtknochenfläche (T.Ar) in mm <sup>2</sup> , p <sup>*1</sup> = 0,024 .....	70
Abbildung 3.2-2: Gesamtknochenfläche (T.Ar) in mm <sup>2</sup> , p <sup>*2</sup> < 0,001 .....	73
Abbildung 3.2-3: Anteil mineralisierter Knochenfläche an der Gesamtknochenfläche (B.Ar/T.Ar), p <sup>*3</sup> = 0,012.....	75
Abbildung 3.2-4: Anteil mineralisierter Knochenfläche an der Gesamtknochenfläche (B.Ar/T.Ar), p <sup>*4</sup> = 0,022, p <sup>*5</sup> < 0,001.. .....	77
Abbildung 3.2-5: Anteil der Kortikalisfläche an der Gesamtfläche (Ct.Ar/T.Ar), p <sup>*6</sup> < 0,001 .....	78
Abbildung 3.2-6: Anteil der Kortikalisfläche an der Gesamtfläche (Ct.Ar/T.Ar), p <sup>*7</sup> = 0,005 .....	78
Abbildung 3.2-7: Anteil der Trabekelfläche an der Gesamtfläche (Tb.Ar/T.Ar), p <sup>*8</sup> < 0,001 .....	79
Abbildung 3.2-8: Anteil der Trabekelfläche an der Gesamtfläche (Tb.Ar/T.Ar), p <sup>*9</sup> = 0,005 .....	79
Abbildung 3.2-9: Anteil des kortikalen Knochens an der Kortikalisfläche (Ct.B.Ar/Ct.Ar), .....	80
Abbildung 3.2-10: Anteil des kortikalen Knochens an der Kortikalisfläche (Ct.B.Ar/Ct.Ar), .....	81
Abbildung 3.2-11: Anteil des trabekulären Knochens an der Trabekelfläche (Tb.B.Ar/Tb.Ar), p <sup>*14</sup> = 0,017, p <sup>*1</sup> < 0,001; .....	82
Abbildung 3.2-12: Anteil des trabekulären Knochens an der Trabekelfläche (Tb.B.Ar/Tb.Ar), p <sup>*15</sup> < 0,001.....	83
Abbildung 3.2-13: Trabekeldicke (Tb.Wi) in µm, beide Methoden, p <sup>*16</sup> = 0,014, p <sup>*17</sup> = 0,024, p <sup>*11</sup> < 0,001.....	84
Abbildung 3.2-14: Kortikalisdicke (Ct.Wi) in mm, p <sup>*18</sup> < 0,001 .....	85
Abbildung 3.2-15: Knochenresorption als prozentualer Anteil des Knochenumfangs, welcher mit Howship'schen Lakunen bedeckt ist, die entweder leer oder mit Osteoklasten gefüllt sind, p <sup>*1</sup> < 0,001... ..	87
Abbildung 3.3-1: Mineralapposition in µm/d, gemessen an Rippendünnschliffen, p <sup>*1</sup> = 0,033, p <sup>*2</sup> = 0,039, p <sup>*3</sup> < 0,001, p <sup>*1</sup> < 0,001 .....	95
Abbildung 3.3-2: Mineralapposition in µm <sup>2</sup> /d, gemessen an Rippendünnschliffen, p <sup>*1</sup> < 0,001.....	96

# 1 Stand des Wissens

## 1.1 Anatomie, Physiologie und Biologie des Knochens

### 1.1.1 Funktion des Knochens

Das Skelett dient dem Körper einerseits als Stützapparat und andererseits als Schutz für Organe wie Hirn und Herz. Die Knochen enthalten 99,9 % des Körpercalciums und nehmen aktiv am Calciumstoffwechsel teil (1). Knochengewebe ist eines der wenigen Gewebe im Körper, welches die Fähigkeit besitzt, bei Beschädigung komplett adäquates neues Knochengewebe zu bilden und zu einer Restitutio ad integrum zu führen (2).

### 1.1.2 Biologie des Knochens

Knochen ist eine hochspezialisierte Form des Bindegewebes und besteht zu etwa 50 % aus Mineralien, zu etwa 25 % aus Wasser und zu etwa 25 % aus organischem Material.

#### 1.1.2.1 Zellen

Wie die meisten reifen Bindegewebe enthält Knochen pro Volumeneinheit relativ wenige Zellen, wobei sich folgende Zellarten morphologisch abgrenzen lassen. **Osteoprogenitorzellen** oder auch Knochenvorläuferzellen sind pluripotente fibroblastenähnliche mesenchymale Zellen, die sich auf den endostalen und periostalen Knochenoberflächen befinden (3). In der Entwicklungsreihe folgen dann **Präosteoblasten**, welche ein bis wenige Zellagen von den Osteoblasten entfernt liegen und noch zur Zellteilung fähig sind. Aus ihnen gehen Osteoblasten, Knochenbelegzellen (*lining cells*) und Osteozyten hervor (4).

**Osteoblasten** sind differenzierte postproliferativ aktive Zellen, die Knochenmatrix synthetisieren (5). Sie befinden sich überall dort auf der Knochenoberfläche, wo Wachstum und Anbau stattfinden. Sie zeigen sich als typische Protein produzierende Zellen mit prominentem Golgi-Apparat und rauem endoplasmatischem Retikulum (RER). Osteoblasten synthetisieren alkalische Phosphatase, Kollagen I, Osteocalcin, Sialoprotein, Osteopontin, Proteoglykane sowie Rezeptoren für Hormone und Wachstumsfaktoren (4). Sie regulieren auch die Mineralisierung der organischen Matrix, wobei die Mechanismen im Einzelnen noch nicht geklärt sind. In Geflechtknochen wird ähnlich wie bei der Knorpelmineralisation die Mineralisation durch Matrixvesikel initiiert, welche durch Knospung von der Osteoblastenmembran entstehen (6). In Lamellenknochen

hingegen sind Kollagenanteile bzw. nichtkollagene Proteine für die Initiation der Mineralisation verantwortlich. Diese findet dort im Wesentlichen vesikelunabhängig im gesamten Gebiet überlappender Kollagenfasern statt (7).

**Knochenbelegzellen** (*lining cells*) sind flache inaktive Zellen, die die Knochenoberfläche bedecken und weder Knochen resorbieren noch bilden, möglicherweise sind sie Osteoblastenvorläufer bzw. ruhende Osteoblasten (4).

**Osteozyten** werden die Zellen genannt, die in die Knochenmatrix eingebaut sind (8). In erwachsenem Knochen gibt es etwa zehnmal mehr Osteozyten als Osteoblasten (9). Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor und sind für die Ernährung des Knochens und die Signalvermittlung innerhalb des harten Gewebes zuständig. Jeder Osteozyt liegt in einer Lakune. Kontakte zwischen den einzelnen Osteozyten innerhalb der Matrix bestehen durch dendritische Zellausläufer, die in Canaliculi liegen und durch offene Verbindungen (*gap junctions*) interzellulären Austausch ermöglichen (10). Da die Ausläufer nicht die Zementlinien benachbarter Osteone überschreiten, bilden die Osteozyten innerhalb eines Osteons ein Synzytium. Um sie herum liegt ein weitverzweigtes extrazelluläres System bestehend aus den Zellzwischenräumen und der mineralisierten Matrix. Diese beiden Systeme dienen als dreidimensionales Sensorsystem und sind möglicherweise die Mechanosensoren, die dafür verantwortlich sind, dass die Form des Knochens von der Funktion beeinflusst wird, wie schon Wolffs Gesetz es beschreibt (11). Osteozyten haben bis zu einem gewissen Grad die Möglichkeit, sowohl Knochen zu synthetisieren als auch zu resorbieren (12).

**Osteoklasten** sind große mehrkernige Zellen, die Knochen, Dentin und Kalkknorpel resorbieren (13). Kalzifiziertes Gewebe abzubauen, scheint ihre einzige Funktion zu sein. Dadurch sind sie verantwortlich für das Remodellieren des Knochens und die Calciumhomöostase des Gesamtorganismus. Sie sind reich an Tartrat resistenter saurer Phosphatase (TRAP) und Kathepsinen und exprimieren Calcitoninrezeptoren (14). Im Kontakt mit der Knochenoberfläche bilden sie eine wellige Zelloberfläche (*ruffled border*). Dort findet die Resorption statt. Um diese Zone herum liegt eine mikroskopisch helle Zone (*clear zone*), welche mikrofilamentreich ist und der Bindung der Osteoklasten an den Knochen dient (15). Osteoklasten gehen aus der Fusion mononukleärer Vorläufer der Monozyten-Makrophagen-Reihe aus verschiedenen hämatopoetischen Geweben wie Knochenmark, Milz und peripherem Blut hervor (16). Diese gelangen auf vaskulärem Wege in den Knochen und differenzieren dort durch osteoblastische Einflüsse zu Osteoklasten (17). Auch mononukleäre Zellen mit

osteoklastischem Phänotyp sind bereits in der Lage, Knochen zu resorbieren, bevor sie zu vielkernigen Osteoklasten herangereift sind. Dabei sind größere Zellen effektiver als kleinere (18). Die osteoklastäre Funktion wird durch Osteoblasten beeinflusst, welche Faktoren produzieren, die zum Teil in die Matrix mit eingebaut werden und zum Teil lokal sezerniert werden (19). Da die meisten osteolytischen Faktoren auf Rezeptoren, welche auf Osteoblasten und nicht auf Osteoklasten lokalisiert sind, wirken (20), nimmt man an, dass so aktivierte Osteoblasten in der Folge Faktoren freisetzen, durch welche schließlich Osteoklasten zur Knochenresorption stimuliert werden (21). Möglicherweise sind auch der Fusionsprozess und die Bildung der welligen Osteoklastenoberfläche osteoblastengesteuert. Ein erstes Zeichen für die folgende Resorption ist der Rückzug von Knochenbelegzellen von der Knochenoberfläche, unbekannt ist bisher, wie eine Resorptionsstelle bestimmt wird (22). Osteoklasten wechseln zwischen Resorptions- und Ruhephasen, da sie in der Lage sind mehrere Resorptionszyklen zu durchlaufen (23).

#### **1.1.2.2 Matrix**

Die Knochenmatrix besteht aus Mineralien, Kollagen, Wasser und nichtkollagenen Proteinen. Im allgemeinen sind die einzelnen Komponenten der Matrix proportional im Knochen in konstanter Menge vorhanden. Die Zusammensetzung ist dabei allerdings abhängig von Spezies, Geschlecht, Alter und verschiedenen Krankheiten.

Knochenmineral ist kohlenstoffhaltiges gering kristallines Analogon zu natürlich vorkommendem Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ) mit geringerem Calciumgehalt. Es unterscheidet sich von geologischen Apatiten durch seine geringere Größe, seine weniger exakte Stöchiometrie und das weniger perfekte atomare Arrangement (24). Aufgrund seiner geringen Kristallgröße und damit einer pro Gewichtseinheit großen Oberfläche stehen eine große Anzahl von Mineralpartikeln für den Austausch und die Reaktion mit anderen Geweben bzw. Blut zur Verfügung. Die Apatitkristalle lagern sich immer parallel zur langen Achse der Kollagenfibrillen an der organischen Matrix an (25).

Als Osteoid wird die nicht mineralisierte organische Knochenmatrix bezeichnet, welche zu etwa 95 % aus Kollagen I besteht. Osteoblasten produzieren in Zellkulturen ausschließlich Kollagen I. Dieses besteht aus Tropokollagen, welches eine Tripelhelix aus 3 Polypeptidketten darstellt, zwei identischen  $\alpha$ -1-Ketten und einer  $\alpha$ -2-Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Moleküle gelangen vom RER zum Golgi-Apparat und werden in Vesikeln sezerniert. Durch Abspaltung der C- und N-Ter-

mini wird die Löslichkeit vermindert. Fibrillen entstehen extrazellulär durch die überlappende Zusammenlagerung der einzelnen Kollagenmoleküle mit definierten Abständen, wobei die intermolekulare Verbindung von Aldehyden des Lysins und Hydroxylysins deren Festigkeit und Zugstabilität erhöht (26). Es wird angenommen, dass die früheste Mineralisierung in den Zwischenräumen dieser Fibrillen stattfindet (25). Kollagen dient dabei als passive Vorlage für die gerichtete Mineraldeposition. Die korrekte Bildung von Kollagen I und dessen Anordnung sind essentiell für die Entstehung von mechanisch stabilem Knochen. Normalerweise findet die Matrixablagerung polarisiert in Richtung der Oberfläche des Knochens statt, manchmal jedoch werden die Osteoblasten ringsherum eingebaut und bilden dann die nächste Schicht Osteozyten (26).

Nichtkollagene Proteine spielen eine wichtige Rolle im Knochenmetabolismus. Sie machen etwa 5 % des Osteoidgewichts aus. Von Knochenzellen synthetisierte nicht-kollagene Proteine sind Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin (Gla-Protein), Phosphoproteine, Proteoglykane, Sialoprotein und Proteolipid (27).

**Osteonectin**, ein Phosphoglykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 35-45 kD, bindet mit hoher Affinität an Hydroxylapatit und Calcium aber auch an Kollagen I. Osteonectin kommt weit verbreitet im Körper vor, wird allerdings im Knochengewebe besonders stark exprimiert. Bindet Osteonectin an Kollagen, so erhöht es die Fähigkeit des Kollagens, Mineralkristalle zu binden, damit stellt es einen Promotor der Mineralisation dar (28).

**Osteopontin** ist ein saures Phosphoglykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 44-75 kD, welches während der frühen Osteogenese die Anlagerung von Osteoblasten an die extrazelluläre Matrix fördert (29). Außerdem kann es die Bindung von Osteoklasten während der Resorption stimulieren (30). Schließlich wirkt es mit bei der Regulierung der Kristallgröße bei der Mineralisation und soll das Apatitwachstum hemmen, vermehrt findet es sich an der Mineralisationsfront (31). Osteopontin ist wie auch Osteonectin nicht knochenspezifisch, sondern findet sich noch in weiteren Geweben (29).

Im Gegensatz dazu kommt das mit dem Osteopontin strukturverwandte **Sialoprotein** außer im Knochengewebe nur noch im Trophoblasten vor. Es findet sich in Osteoid, ist aber besonders reichlich an Mineralisationsfronten lokalisiert, sein Effekt auf die Mineralisation allerdings noch nicht geklärt (32).

**Osteocalcin** wirkt regulierend auf die Aktivität der Osteoklasten und ihrer Vorläufer und somit auf die Knochenresorption (33). Da ihm auch eine hemmende Wirkung auf das



Apatitkristallwachstum zugeschrieben wird, markiert Osteocalcin möglicherweise den Umschlagpunkt von Knochenformation zu Knochenresorption (34). Beschrieben wird auch eine Komplexbildung zwischen Osteocalcin und Osteopontin (35). Osteocalcin wird im Serum als Index für den Knochenmetabolismus gemessen, außerdem nimmt man an, dass Osteocalcin eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Knochenhomöostase spielt (36).

**Phosphoproteine** hemmen zum Teil die Bildung von Hydroxylapatit (37). Phosphoproteinkonzentrationen sind an der Mineralisationsfront und in ektopen Kalzifikationen erhöht. Außerdem haben einige Phosphoproteine die Fähigkeit, in vitro die Bildung von Hydroxylapatit aus metastabilen Calcium-Phosphat-Lösungen zu fördern (38).

**Proteolipide** scheinen eine direkte Rolle bei der Mineralbildung zu spielen. Sie sind Bestandteile der Knochenzellmembranen. Proteolipide und ihr Bestandteil, ein saurer Calcium-Phospholipid-Phosphat-Komplex, werden an Zell- oder Matrixvesikelmembranen vor der Mineraldeposition gebildet und rufen dort die Initiation der Mineralablagerung hervor (39).

**Proteoglykane** (Decorin, Biglykan, u.a.) bestehen aus einem Kernprotein, an das kovalent Glukosaminoglykane gebunden sind, welche aus sich wiederholenden sulphatierten Kohlenhydrateinheiten wie Chondroitinsulphat, Dermatansulphat, Keratansulphat, Heparansulphat und Hyaluronsäure zusammengesetzt sind. Die verschiedenen Proteoglykane beeinflussen die Zell-Matrix-Interaktion und den Zellmetabolismus (40). Möglicherweise regulieren sie die Hydrierung, Ernährung und Mineralisation des Gewebes (41).

**Wachstumsfaktoren** spielen bei den lokalen Regelmechanismen der Knochenformation und –reparation eine wichtige Rolle (42-45). Die wichtigsten Vertretergruppen werden nachfolgend beschrieben, mit Ausnahme von *insulin-like growth factor* (IGF), welcher unter 1.2.3 ff. eingehend behandelt wird. Vertreter aus jeder dieser Gruppen beeinflussen auch die Osteogenese während der embryonalen Entwicklung.

**Fibroblast growth factors (FGFs)** gehören zu einer Familie, welche aus 9 strukturverwandten Proteinen besteht (46). Saurer und basischer FGF respektive FGF-1 und FGF-2 wurden zuerst entdeckt, weisen eine Homologie von 55 % auf und binden an den gleichen Rezeptor. Saurer FGF ist ein 16 kD und basischer FGF ein 17 kD Polypeptid (47). Außer von Knochen- und Knorpelzellen werden FGFs auch von Monozyten und Makrophagen gebildet. Bisher hat man vier FGF-Rezeptorgene isoliert, die multiple Isoformen eines FGF-Rezeptors vom Tyrosinkinasetyp kodieren. FGFs sind während

der Frakturheilung von Bedeutung (48). Im Tierversuch zeigte FGF-1 einen positiven Effekt auf die Kallusmenge und den Mineralsalzgehalt (49). Die Ergebnisse von Studien zu basischem FGF zeigten diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse (50,51).

**Platelet derived growth factor (PDGF)** ist ein 28-35 kD-Dimer bestehend aus den zu 60 % homologen Peptiden A und B, so dass 3 verschiedene Formen vorkommen. PDGF-AB und BB sind systemische Wachstumsfaktoren, PDGF-AA kommt als lokaler Wachstumsfaktor im Knochen vor (45). Synthetisiert wird PDGF von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Die Wirkung von PDGF wird durch einen spezifischen Rezeptor vom Tyrosinkinasetyp vermittelt, welcher aus zwei Untereinheiten gebildet wird, die im Rahmen des Bindungsvorgangs ein Dimer bilden (52). PDGF-Rezeptoren findet man auf Zellen des Skelettstoffwechsels, sowohl während der embryonalen Skelettbildung, als auch bei Reparationsvorgängen nach Frakturen beim erwachsenen Individuum (53,54). PDGF wirkt chemotaktisch auf Osteoblasten und -vorläuferzellen, stimuliert aber auch die Vermehrung von Fibroblasten (55). Er ist ein wichtiger Faktor bei der normalen Wund- und Frakturheilung (56).

**Transforming growth factors  $\beta$  (TGFs- $\beta$ )** kennt man fünf Subtypen, die TGFs- $\beta$  1-5 genannt werden. Sie sind 25 kD Homodimere mit einer 60 bis 80 prozentigen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz. Die verschiedenen TGFs- $\beta$  sind, sowohl innerhalb einer Spezies als auch beim Vergleich verschiedener Spezies untereinander sehr ähnlich. Drei TGF- $\beta$ -Rezeptortypen I-III findet man auf vielen unterschiedlichen Zelltypen. Eine lösliche Form des Typ III TGF- $\beta$  Rezeptors wurde im Serum gefunden und fungiert als TGF- $\beta$  Bindungsprotein (57). Osteoblasten weisen die größte Anzahl TGF- $\beta$ -Rezeptoren auf ihrer Oberfläche auf (58). TGF- $\beta$ s steigern die Kollagensynthese und sind in der Lage eine orthotope enchondrale Ossifikation zu induzieren (59,60). Mesenchymale Stammzellen werden von TGF- $\beta$  zu Proliferation und Differenzierung veranlasst (61,62). Knochenmatrix ist das größte TGF- $\beta$  Reservoir des Körpers (63). Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen eine Beschleunigung der Frakturheilung bzw. des Implantateinwachsens durch Applikation von TGF- $\beta$ s (64-68).

**Bone morphogenetic proteins (BMPs)** sind eine Gruppe von mindestens 15 verschiedenen Glykoproteinen, welche in geringen Konzentrationen im Knochen vorkommen und zumeist als Wachstumsfaktoren fungieren. Sie liegen als 30-38 kD Homodimere vor, haben eine Länge zwischen 100 und 140 Aminosäuren und sind sowohl innerhalb einer Spezies, als auch bei verschiedenen Spezies untereinander sehr ähn-

lich. Sie gehören alle außer BMP-1 mit TGF- $\beta$  einer Superfamilie an (57). BMPs sind verantwortlich für die osteoinduktiven Eigenschaften von demineralisierter Knochenmatrix (69). Durch Stimulierung der Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Osteoblasten und Chondroblasten beeinflussen sie die enchondrale Knochenbildung (70). BMPs beeinflussen auch pathologische Knochenbildungsprozesse bei heterotopen Ossifikationen und Knochentumoren (71). TGFs- $\beta$  und BMPs werden von Zellen des Knochenstoffwechsels produziert, wirken chemotaktisch auf Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen und beeinflussen deren Proliferation und Differenzierung (72,73).

### 1.1.3 Umbau des Knochens

Knochenumbau (Remodellierung) ist ein lebenslang ablaufender Prozess, durch den alter Knochen abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt wird. Der Knochenumbau, welcher permanent im Knochengewebe stattfindet, dient im wesentlichen drei Funktionen. Erstens kann so die Anatomie des Gewebes dem Belastungszustand der jeweiligen Knochenregion angepasst werden, wie es Wolff bereits 1892 in „Das Gesetz der Transformation der Knochen“ (74) beschrieb, zweitens können Mikroschäden repariert werden und drittens entsteht durch den Knochenumbau erst die Möglichkeit der Teilnahme des Knochens an der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase (75). Die Remodellierung zeigt allerdings nur eine verzögerte Wirkung, so dass die kurzfristige Calciumfreisetzung wahrscheinlich durch Knochenbelegzellen ausgelöst wird (76). Man unterscheidet einen gezielten Umbau an beschädigten Stellen von einem mehr oder weniger zufällig beginnenden, welcher davor schützen soll, dass älterer Knochen, der dichter und damit spröder ist, akkumuliert (77-80). In beiden Fällen läuft die Knochenresorption gekoppelt an die Knochenformation ab. Solange sich Formation und Resorption die Waage halten, bleiben die Umbauvorgänge makroskopisch unsichtbar. Allein durch den ständigen Umbau ist es möglich, dass für den Knochenmetabolismus wichtige diagnostische Marker ins Blut gelangen. Viele Vorgänge innerhalb der Remodellierungssequenz sind anhand von Fluoreszenzmarkierung des Knochens beschrieben worden (81,82). Eriksen et al. rekonstruierten den zeitlichen Ablauf des Umbaus (83). Auf mikroskopischer Ebene findet dieser Prozess aktiv im Rahmen von multizellulären Basiseinheiten (*basic multicellular units* BMUs) oder Knochenumbaueinheiten (*bone remodeling units* BRUs) statt, welche eine Gruppe verschiedener Zellen darstellen, die in bestimmten Zeiträumen die Resorption und die Formation bewirken (81). Zu jeder

Zeit befinden sich etwa 20 % der spongiösen Knochenoberfläche im Umbau. An jeder Stelle der Knochenoberfläche findet Remodellierung alle 2-4 Jahre statt (80). Die BRUs haben in verschiedenen Knochenarten verschiedene Formen, bleiben aber das typische Modell des Knochenumbaus (84,85). Das Endresultat einer BRU ist eine Knochenstruktureinheit (*bone structural unit* BSU). Die Menge des neugebildeten Knochens hängt dabei nicht nur von der Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität pro BRU ab, sondern auch von der Anzahl BRUs (80). Die Bildungsrate von BRUs wird Aktivierungsfrequenz genannt und ist bei den meisten Knochenerkrankungen der wichtigste Faktor für die Veränderung der Knochenmasse (86). Eine Remodellierungssequenz besteht aus Origination und Aktivierung, Resorption, Formation und Mineralisierung.

#### **1.1.3.1 Origination und Aktivierung**

Origination ist der erste Schritt des Remodellierungszyklus. Es ist nicht bekannt, was die Origination einer neuen BMU initiiert, allerdings sind viele Faktoren wie Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren insbesondere auch IGF-I daran beteiligt, dass die notwendigen Zellen zum Ort des Umbaus gelangen (87). Zum Teil sind Mikrofrakturen die Ursache oder auch mechanosensorische Signale von Osteozyten oder Knochenbelegzellen (88). Durch Signale von bereits vorhandenen Zellen der BMU bzw. Osteozyten werden Osteoklasten und –vorläufer aus dem Blut zum Ort der Remodellierung geleitet. Jeder Umbauzyklus beginnt mit der Aktivierung von Osteoklastenvorläufern zu mehrkernigen Osteoklasten, welche die Resorption beginnen (80). Da die Lebensdauer der einzelnen Zellen einer BMU kürzer ist als die der gesamten BMU, müssen ständig Zellen aktiviert werden, d.h. Origination findet pro BMU nur einmal statt, Aktivierung hingegen kontinuierlich entlang der Ausbreitungsfront der BMU (85).

#### **1.1.3.2 Resorption**

Während der Resorption werden Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , FGF und IGF aus der Matrix freigesetzt, welche im vorangegangenen Zyklus dort eingelagert worden sind. Diese sind wichtig für die Rekrutierung von Osteoblasten und somit möglicherweise für die Kopplung von Resorption und Formation. Die Resorption wird in 2 Phasen unterteilt: eine etwa 8 Tage dauernde schnelle Resorption durch mehrkernige Osteoklasten und eine ca. 34 Tage dauernde langsamere Resorption durch mononukleäre Zellen (83). Osteoklasten sind ca. 12 Tage aktiv und gehen dann durch TGF- $\beta$  gesteuerte Apoptose zugrunde (80). Die Erosionstiefe ist von der Lebensdauer der Osteoklasten abhängig. In

kortikalem Knochen dauert die Erosion durch die Osteoklasten 30 Tage, wobei ein Tunnel mit einem Durchmesser von ca. 150  $\mu\text{m}$  entsteht. Diese Phase wird nochmals unterteilt in eine ca. 10 Tage dauernde präosteoklastische Phase und eine ca. 15 Tage dauernde monozytische Phase (83). Die Erosionsperiode in spongiösem Knochen dauert ca. 43 Tage und wird in eine 7 tägige osteoklastäre Resorptionsphase und eine anschließende 36 tägige mononukleäre Resorptionsphase unterteilt. Die Erosionstiefe beträgt etwa 60  $\mu\text{m}$  (83). Zwei Varianten von Erosionsoberflächen werden in kortikalem Knochen gefunden: eine kegelförmige mit Osteoklasten und eine eher flache ovale ohne Osteoklasten (89). Diese flacheren Resorptionslakunen entstehen möglicherweise durch eine zeitlich begrenzte Unterbrechung oder eine vollständige vorzeitige Beendigung der Resorption. Beide Produkte der Resorption werden Howship'sche Lakunen genannt. In ähnlicher Form ist dies auch für spongiösen Knochen beschrieben (90).

#### **1.1.3.3 Formation und Mineralisation**

Nach Beendigung des Resorptionsvorganges wandern Präosteoblasten in das Gebiet ein, die zu Osteoblasten differenzieren. Diese bilden neue Knochenmatrix, welche in der Folge mineralisiert. Nach einer ca. 5 Tage dauernden Phase der Präosteoblasteneinwanderung folgt die osteoblastische Matrixsynthese (83). Die Matrix kalzifiziert nach 15 bis 20 Tagen in der gleichen Geschwindigkeit, wie das Osteoid angelagert wird, welche nach Tetrazyklinlabelmessung ca. 1  $\mu\text{m}/\text{d}$  beträgt (91). Dieser Zeitraum wird auch verzögerte Mineralisationszeit genannt (*mineralization lag time*) (83). Die Osteoblasten verringern langsam die Osteoidproduktion und werden dabei flacher. Einige werden zu Osteozyten, andere zu Knochenbelegzellen (92). Die gesamte Formationsphase dauert im kortikalen Knochen ca. 90 Tage. Der neugebildete Knochen füllt den durch die vorangegangene Resorption entstandenen Tunnel mit einer durchschnittlichen Wanddicke von 40 bis 60  $\mu\text{m}$  und lässt einen Zentralkanal von ca. 30  $\mu\text{m}$  Durchmesser frei. Die gesamte Formationszeit beträgt in spongiösem Knochen etwa 145 Tage, wobei die Resorptionslakunen ebenfalls mit ca. 40 bis 60  $\mu\text{m}$  dickem neuen Knochen gefüllt werden (83). Auch nach abgeschlossenem Remodellierungszyklus schreitet die Mineralisation weiter fort, wodurch älterer Knochen um bis zu 25 % dichter als jüngerer erscheint (78). Die Dauer dieses Vorganges ist bislang nicht bekannt.

#### **1.1.3.4 Kopplung**

Man geht davon aus, dass in gesundem Knochen durch die Kopplung (*coupling*) der Formation an die Resorption in den BRUs die resorbierte Menge Knochen durch die gleiche Menge neuen Knochen ersetzt wird. Diese Theorie wird auch Quantumkonzept des Knochenumbaus genannt (81). Dabei beschreibt der Begriff Kopplung eine zeitliche Folge von Abläufen, wodurch gesichert ist, dass der in der osteoklastären Resorptionsphase entfernte Knochen in der osteoblastären Formationsphase wieder ersetzt wird. Ein Ungleichgewicht entsteht dadurch, dass entweder die Resorptionslakunen nicht vollständig oder über das ursprüngliche Maß hinaus gefüllt werden. Für diesen Koppungsprozess erweist sich die mechanische Stimulation als wichtig, da z.B. Immobilisation durch Entkopplung von Formation und Resorption zu einer negativen Knochenbilanz führt (86).

#### **1.1.4 Anatomie des Knochens**

Das Skelett besteht aus zwei makroskopisch verschiedenen Arten von Knochen, einerseits kortikalem Knochen, welcher hauptsächlich in langen Röhrenknochen und Rippen vorkommt, und spongiösem Knochen auf der anderen Seite, der in Wirbeln und Becken anzutreffen ist (86). Kortikaler Knochen macht ca. 80 % der gesamten Knochenmasse aus, spongiöser 20 %. Da aber spongiöser Knochen aufgrund seiner größeren Oberfläche einen aktiveren Knochenstoffwechsel aufweist, ist der Gesamtknochenstoffwechsel etwa gleichmäßig auf beide Knochentypen verteilt (93). Sowohl kortikaler als auch spongiöser Knochen zeigen in der Polarisationsmikroskopie eine streng lamelläre Struktur, die durch die Anordnung der Kollagenfibrillen in abwechselnder Orientierung entsteht. Dadurch erhöht sich die mechanische Stabilität (86). In Geflechtknochen findet man diese Anordnung nicht, stattdessen sind die Kollagenfibrillen ungeordnet, was die mechanische Stabilität mindert. Geflechtknochen entsteht bei der Bildung von primärem Knochen und bei Zuständen mit erhöhtem Knochenumbau, wobei an ruhenden spongiösen Knochenoberflächen eine *de novo* Synthese von Knochen beginnt (86). Außerdem wurde die Bildung von Geflechtknochen periostal an kortikalem Knochen bei starker Belastung nachgewiesen (94-96).

##### **1.1.4.1 Kortikaler Knochen**

Kortikaler Knochen ist kompakt und dicht wie z.B. die Diaphysen langer Röhrenknochen oder die Grund- und Deckplatten von Wirbelkörpern. Der Umbau findet durch BRUs

statt, die in kortikalem Knochen ca. 400  $\mu\text{m}$  lang und 200  $\mu\text{m}$  breit sind (97). Eine BRU bohrt sich wie ein Kegel durch die Kortikalis und hinterlässt neugebildeten Knochen. Eine komplette BRU wird auch als Haversssystem oder Osteon bezeichnet, welches aus konzentrisch angeordneten Knochenlamellen besteht. Im Zentrum befindet sich der Havers'sche Kanal, der Blutgefäße enthält. Zumeist liegen die Kanäle parallel zueinander in Richtung der Knochenlängsachse. Bei normalem Knochenstoffwechsel und normaler Größe existieren beim erwachsenen Menschen ca.  $21 \times 10^6$  BSUs mit einer Gesamtumbaufläche von 3,5  $\text{m}^2$  (93). Normalerweise hat die Kortikalis eine Porosität von weniger als 5 %, welche durch die Havers'schen Kanäle oder den Umbau entsteht. Bei erhöhter Umbaurate ist mit einer Erhöhung der Porosität und einer Verringerung der kortikalen Knochenmasse zu rechnen. Jedoch kann durch intrakortikale Remodellierung nie eine positive Knochenbilanz entstehen, wie z.B. an spongiösen Knochenoberflächen (98). Kortikaler Knochen kann in zwei funktionell verschiedene Typen eingeteilt werden: periostalen und endostalen Knochen. Die periostale Knochenoberfläche spielt eine wichtige Rolle bei appositionellem Wachstum und Frakturheilung. Hier entsteht ein Knochenzuwachs, der sich an langen Röhrenknochen als Vergrößerung des Durchmessers bemerkbar macht. Die endostale Knochenoberfläche zeigt eine höhere Umbauaktivität vermutlich aufgrund der Nähe zum Markraum mit seiner Zytokinumgebung oder der größeren mechanischen Belastung. Hier überwiegt Resorption die Formation, was zu einer Vergrößerung des Markraums führt (86).

#### **1.1.4.2 Spongiöser Knochen**

Spongiöser Knochen besteht aus knöchernen Trabekeln, dünnen Platten oder Stäben, mit einer Dicke zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 400  $\mu\text{m}$ , die honigwabenartig verbunden sind, wodurch bei minimalem Gewicht eine maximale mechanische Belastbarkeit gegeben ist. Die Strukturen adaptieren ihre Ausrichtung gemäß der auftretenden Belastungen. Eine spongiöse BRU entspricht morphologisch einer in der Mitte längs durchgeschnittenen kortikalen BRU, es entsteht also eine plattenartige halbmondförmige Struktur, die ca. 300  $\mu\text{m}$  dick ist und mehrfach so lang (85,99). Ihre Funktionsweise gleicht der im kortikalen Knochen, nur entsteht am Ende kein röhrenförmiges Osteon, sondern ein neues Knochenpaket oder eine neue Knochenwand, was dann trabekuläres Osteon genannt wird. Man schätzt, dass eine Gesamtzahl von  $14 \times 10^6$  trabekulären Osteonen existiert, bei einer totalen trabekulären Oberfläche von 7  $\text{m}^2$  (93). Im Gegensatz zu kortikalem Knochen ist spongiöser Knochen aufgrund seiner Anatomie zur Mikrokallus-

bildung in der Lage. Ein weiterer Unterschied sind die in kortikalem Knochen nicht vorkommenden Knochenbelegzellen, die in spongiösem Knochen am Umbau beteiligt sind. Weiterhin können in spongiösem Knochen durch Umbauvorgänge Trabekelanteile aus dem Zusammenhang isoliert werden. Nach einer solchen Kontinuitätsunterbrechung sind die strukturelle Funktion und die Möglichkeit, mechanische Kräfte aufzunehmen, aufgehoben und das Fragment wird resorbiert (84,100-102).

### **1.1.5 Vergleich des Knochens von Mensch und Schwein**

Schweine weisen im Bezug auf ihre Stoffwechselprozesse ebenso wie auf ihre Knochenqualität und den Knochenumbau große Analogien zum Menschen auf. Dimension, mechanische Eigenschaften und Physiologie des Schweineknochens sind denen des humanen Knochens sehr ähnlich (108). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der Knochenstoffwechsel der meist experimentell verwendeten Nager erheblich von dem des Menschen (103). Der hormonelle Zyklus des weiblichen Schweins ist mit ca. 21 Tagen dem des Menschen sehr ähnlich (104). Wie der Mensch haben die Schweine einen tagaktiven Biorhythmus. Als Allesfresser sind sie auch ein geeignetes Modell für die humane gastrointestinale Funktion (105). Der große Unterschied verglichen mit allen ansonsten als Modell untersuchten Spezies liegt darin begründet, dass der Mensch die einzige ausschließlich zweibeinige Säugetierspezies auf dieser Welt ist. Das heißt, die Aufgaben der Muskulatur sowie die Belastung z.B. der Wirbelsäule sind völlig verschieden vom Vierbeiner, welche im allgemeinen aufgrund der horizontalen Orientierung der Wirbelsäule schmalere Bandscheiben, eine verminderte lumbale Lordose und im Vergleich zum Menschen einen kleineren anteroposterioren Durchmesser des Wirbelkörpers haben (106). Die porcine trabekuläre Knochenstruktur wird als der humanen sehr ähnlich beschrieben (107,108). Das Schwein verfügt über dem Menschen ähnliche kortikale und trabekuläre Remodellierungsprozesse (109). Knochenmasse und trabekuläre Dichte allerdings sind bei Schweinen als größer im Vergleich zum Menschen ermittelt worden (104,110). Das Yucatan Minischwein ist ein anerkanntes Modell für Untersuchungen des Knochenmetabolismus (111,112).

### **1.1.6 Systemische Auswirkungen von Skelettverletzungen**

Die lokalen und systemischen Abläufe nach Skelettverletzungen sind wiederholt beobachtet und beschrieben worden. Verschiedene Studien beschreiben, dass die Heilung verletzten Knochens oder Knochenmarks von einem systemischen die Knochen-



bildung stimulierenden Effekt an vom Ort der Verletzung entfernten unverletzten Lokalisationen des Skeletts begleitet wird (113-116). Die Knochenheilung nach Skelettverletzung folgt dabei einer genauen Sequenz lokaler und systemischer Regulationsmechanismen (117). Zunächst nahm man an, dass die Ursachen für diese Vorgänge in den bekannten systemischen hormonellen Veränderungen, die nach einer Knochenverletzung entstehen, begründet sind (118-120). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die lokale Bildung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren, welche aus dem Knochenmark in die Zirkulation gelangen, für diesen Effekt die Hauptverantwortung tragen (121-124). Der Beginn folgt dabei schnell auf die Verletzung, die systemische Beeinflussung funktioniert anscheinend nicht nach ausschließlich kortikalen Läsionen (125,126). Hauptsächlich führt eine Verletzung des Knochenmarks zu dieser Stimulation, was für den starken Einfluss lokal freigesetzter, in den systemischen Kreislauf gelangter osteogener Substanzen spricht (114). Beteiligte Mediatoren sind BMPs, IGF, TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, Prostaglandine und auch Hormone wie Parathormon, Wachstumshormon und Glukokortikoide (124,127). Die Ursache der Stimulation könnten sowohl eine erhöhte Zellzahl als auch eine verstärkte Zellaktivität oder auch beides sein (128). Man nimmt jedoch an, dass die humoralen Effekte mehr die Osteoblastenrekrutierung als deren Funktion betreffen (80). Allerdings gibt es bisher nur wenige Angaben über die Veränderungen in der Mineralisationsphase und die Stimulation der Knochenbildung an von der Verletzung entfernten Lokalisationen des Skeletts (113,129-133). Die Heilung eines lokalen Knochendefekts führt nicht nur zu einem systemischen Akzelerationsphänomen (SAP), welches den Knochenumbau des Gesamtorganismus beschleunigt, sondern auch zu einem regionalen Akzelerationsphänomen (RAP) im an den Defekt angrenzenden Bereich (134,135). Dabei betrifft das SAP den trabekulären Knochen und führt dort zu gesteigerter Knochenbildung, das RAP hingegen entsteht möglicherweise aufgrund der lokalen mechanischen Instabilität (116).

### **1.1.7 Distraktionsosteogenese**

Das Distraktionsosteogenesemodell zeigt den Einfluss der mechanischen Bewegung auf die systemische Stimulation, vergleicht man es mit rigide stabilisierten Knochenläsionen (136). Bei der Distraktionsosteogenese findet hauptsächlich intramembranöse Ossifikation statt, während die reguläre Frakturheilung auf dem Mechanismus der enchondralen Ossifikation beruht (137,138). Zur Freisetzung der Mediatoren trägt der mechanische Reiz auf die Zellen durch die Distraktion einen großen Teil bei. Die

mechanische Belastung stimuliert die Proliferationsrate und die Mitogenproduktion sowie die mitotische Zellaktivität, so dass auch systemisch wirksame Faktoren freigesetzt werden, welche die Osteoblastenaktivität steigern und die Kallusbildung beeinflussen (139-143). TGF- $\beta$  ist ein Mediator dieses Effekts, dessen Freisetzung möglicherweise durch die mechanische Belastung reguliert wird. Die PDGF-Freisetzung scheint dabei von mechanischer Belastung unabhängig zu sein (116,144).

## 1.2 Wachstumshormon

Vor mehr als 100 Jahren wurde der Zusammenhang zwischen Akromegalie und Pathologie der Hypophyse entdeckt (145). 1909 vermutete Cushing, dass die Hypophyse eine lebenswichtige Substanz sezerniert (146). Bereits 1921 wurde durch Injektion von bovinem Hypophysenextrakt bei Ratten ein supranormales Wachstum erzielt (147). Erstmals wurde 1958 durch humanes Wachstumshormon ein stimulierender Effekt auf das Wachstum eines hypophysären Zwergs bewirkt (148). 1959 wurde die Speziespezifität von Wachstumshormon nachgewiesen, wobei diese nur in einer Richtung gegeben ist, d.h. das Hormon höherer Spezies wirkt bei niederen, aber nicht umgekehrt (149).

### 1.2.1 Struktur und Bildung

#### 1.2.1.1 Ort der Bildung

Wachstumshormon (*growth hormone* bzw. GH), welches auch Somatotropin (STH) genannt wird, wird in der Adenohypophyse in den  $\alpha$ -Zellen, die auch als somatotrophe Zellen bekannt sind, gebildet. Das Gen für das Hormon liegt auf Chromosom 17.

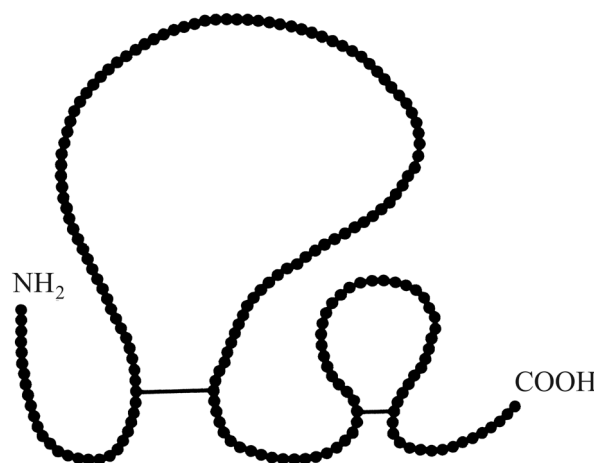


Abbildung 1.2-1: Wachstumshormon (human) in seiner Struktur (368)

### 1.2.1.2 Aufbau

Wachstumshormon ist ein Peptidhormon, das in verschiedenen Varianten vorkommt. Zu 90-95 % ist es eine aus 191 Aminosäuren bestehende Einzelkette mit 2 Disulphidbrücken und einem Molekulargewicht von ca. 22 kD (150). Eine 20 kD Variante, die 15 Aminosäuren kürzer ist, macht 5-10 % aus (151). Weitere abgewandelte Varianten finden sich in der Plazenta. Posttranslationale Modifikationen wie Azylierung, Deamidierung und Glykosylierung sind ebenfalls beschrieben (152-154). GH von Mensch und Schwein unterscheiden sich in 61 Aminosäuren (155-158). Eine Unterscheidung der Spezieszugehörigkeit erfolgt durch Voranstellung eines entsprechenden Buchstabens (z.B. h-GH/p-GH für humanes respektive porcines GH). Weitere Modifikationen werden ebenfalls durch entsprechende Buchstaben bzw. Buchstabengruppen gekennzeichnet.

### 1.2.2 Hypothalamus-Hypophysen-Achse

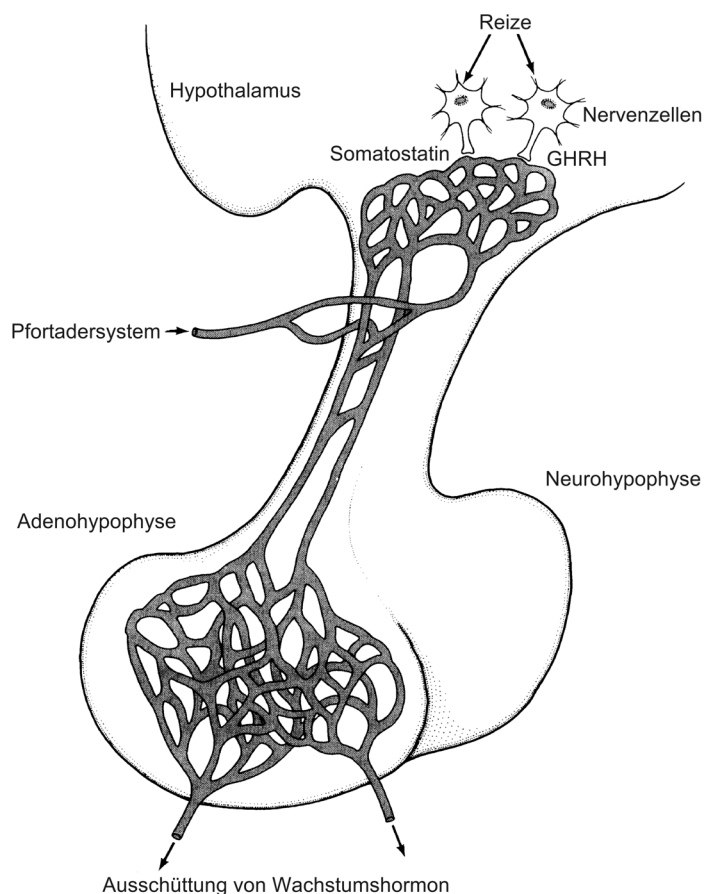


Abbildung 1.2-2: Hypothalamus-Hypophysenachse, Steuerung der Wachstumshormonfreisetzung über Releasing- und Inhibiting-Hormone aus dem Hypothalamus, welche über den Pfortaderkreislauf zur Adenohypophyse gelangen (368)

### **1.2.2.1 Steuerung der Sekretion**

Zwei Peptide aus dem Hypothalamus regulieren die Synthese und Ausschüttung von GH über spezifische Rezeptoren auf den  $\alpha$ -Zellen. Sie gelangen über das hypophysäre Pfortadersystem zum Wirkort. Das Freisetzungshormon (*growth hormone releasing hormone* bzw. GHRH), welches als Dekapeptid vom medioventralen Hypothalamus sezerniert wird, steigert die Sekretion von Wachstumshormon aus der Adenohypophyse (159,160). Das Somatostatin (*growth hormone inhibiting hormone* bzw. GHIH), ein ebenfalls aus dem Hypothalamus stammendes Tetradekapeptid, hemmt die Freisetzung (161,162). Synthese und Sekretion von GHRH und GHIH werden neuronal und humoral gesteuert sowie durch den Biorhythmus über das limbische System.

### **1.2.2.2 Freisetzung und Ausscheidung**

Für die biologische Wirkung des Wachstumshormons ist seine pulsatile Freisetzung wichtig (150). Verschiedene Spezies unterscheiden sich dabei durch spezifische neuroendokrine Rhythmen. Der pulsatile Charakter der GH-Sekretion, der während des gesamten Lebens erhalten bleibt, beruht hauptsächlich auf der Steuerung durch GHIH (163). Eine Frequenz zwischen einem Puls pro Stunde und einem Puls alle vier Stunden wird angegeben. Erhöhte GH-Spiegel entstehen durch größere Amplituden und nicht durch erhöhte Pulsfrequenz. Die GH-Sekretion erfolgt primär während des Schlafes, die höchsten GH-Spiegel treten während der ersten Slow-wave-Phase auf. Hohe GH-Spiegel konnten während der späten Fetalphase und der Pubertät gemessen werden (164). Mit dem Alter nimmt die GH-Sekretion ab, was auch Somatopause genannt wird (165,166). Auch von anderen Faktoren wie Geschlecht, Schlaf, Sport, Ernährung und Krankheiten wie Diabetes mellitus wird die GH-Freisetzung beeinflusst (167-172). Provokationstests für die Stimulation der endogenen GH-Sekretion sind Fasten, Training bzw. Bewegung, Applikation von L-Dopa, Clonidin, Arginin oder Insulin, wobei die insulininduzierte Hypoglykämie der Goldstandard ist (173). Die Ausscheidung von GH erfolgt renal. Es wird glomerulär filtriert und im proximalen Tubulussystem abgebaut.

### **1.2.3 Wirkmechanismen**

GH wirkt einerseits direkt auf Zellen und Gewebe und bewirkt dort eine Stimulation der Differenzierung, Proliferation und Proteinsynthese, andererseits wird ein Teil der GH-Wirkung über Somatomedine vermittelt.

### **1.2.3.1 Somatomedin- und duale Effektortheorie**

Anlass zu Diskussionen lieferte während der letzten zwei Jahrzehnte immer wieder die Frage, ob GH direkt auf das Gewebe wirkt oder über einen in der Leber produzierten Faktor. Dieser wurde 1957 entdeckt und zunächst Sulphatierungsfaktor genannt, später dann Somatomedin, welches, seit seine insulinähnliche Wirkung bekannt ist, insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (*insulin-like growth factor* bzw. IGF) genannt wird (174-177). Die ursprüngliche Somatomedintheorie geht davon aus, dass die Wirkung von GH ausschließlich durch endokrin aktives IGF-I vermittelt wird, dessen Synthese in der Leber durch GH stimuliert wird (178). Später wurde beobachtet, dass GH und IGF-I in verschiedenen Stadien des Zellwachstums auf die Zellen wirken. GH stimuliert junge Präadipozyten, IGF-I stimuliert die Zellen in einem späteren Entwicklungsstadium (179). Die daraus entstandene Theorie, dass GH auf die Progenitorzellen wirkt und IGF-I die folgende klonale Expansion stimuliert, wurde „duale Effektortheorie“ genannt (180). Nur GH stimuliert lokal appliziert die Produktion von IGF-I durch die Stimulation der Transkription des IGF-I Gens (181). Durch IGF-Antikörper kann die lokale stimulierende Wirkung von GH wieder aufgehoben werden, was die wichtige Rolle von IGF bei der Expression des GH-Effektes auf lokalem Niveau zeigt (182,183). Es besteht also auf verschiedenen Ebenen eine Verknüpfung der Wirkungsmechanismen von GH und IGF sowie teilweise auch eine additive Wirkung (184).

### **1.2.3.2 Direkte Wirkung von Wachstumshormon**

GH zeigt eine direkte Wirkung auf die Entwicklung verschiedener Gewebe: Knochenwachstum (185), Chondrozytenproliferation (186), Chondroblastendifferenzierung (187), Lymphozytenproliferation (188), Myoblastendifferenzierung (189). Ein spezifischer GH-Rezeptor konnte auf verschiedenen Zellen nachgewiesen werden (190). Der GH-Rezeptor gehört zur Familie der Zytokin/Hämatopoetin-Rezeptor-Superfamilie (191). Er ist ein Transmembranrezeptor mit 620 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 70 kD (glykosyliert 130 kD). Humanes GH besitzt 2 Rezeptorbindungsstellen, durch die es nacheinander an zwei GH-Rezeptoren bindet und somit zu einer Dimerisation des Rezeptors führt (192). Nur in dieser Form kann die GH-Wirkung übertragen werden (193). Über eine kurze Feedbackschleife wirkt GH auch regulierend auf die GH-Rezeptor Expression (194).

Es finden sich lösliche Formen wie das Wachstumshormonbindungsprotein (*growth hormone binding protein* bzw. GHBP), von dem man annimmt, dass es durch proteolyti-

sche Spaltung des extrazellulären Anteils des membrangebundenen Rezeptors entsteht (195,196). GH bildet mit diesen 1:1 bzw. 1:2 (GH/GHBP) Komplexe (197,198). Im Plasma zirkuliert GH gebunden an GHBP, wovon 2 bekannt sind, GHBP-1 mit geringer Kapazität und hoher Affinität und GHBP-2 (nicht rezeptorverwandt) mit geringer Affinität und hoher Kapazität (199). GHBPs verlängern die Halbwertszeit des zirkulierenden GHs, unter anderem da der GH/GHBP-Komplex zu groß ist für die renale Filtration (200,201). GHBPs dienen somit der Aufrechterhaltung des zirkulierenden GH-Reservoirs und sorgen für ein dynamisches Equilibrium zwischen freiem und gebundenem GH zum Ausgleich der pulsatilen Freisetzung. GHBP-Level variieren stark zwischen den Spezies, so wurden bei Schweinen und Kaninchen sehr hohe und bei Schafen und Rindern niedrige Werte gefunden (202). Humane Werte liegen dazwischen (ca. 45 % GH gebunden an GHBP-1 und 5-10 % an GHBP-2) (203).

#### **1.2.3.3 IGF-vermittelte Wirkung von Wachstumshormon**

Zwei IGFs sind bekannt. IGF-I ist ein 7,6 kD Polypeptid, bestehend aus 70 Aminosäuren, welches auf Chromosom 12 auf einem 90 kb Gen exprimiert wird. IGF-I wird aufgrund einer Stimulation durch GH in verschiedenen Geweben, besonders aber in der Leber gebildet. GH reguliert über den GH-Rezeptor durch hauptsächlich transkriptionale Mechanismen die Synthese und Sekretion von IGF-I (204,205). 2 Stunden nach GH-Gabe steigt die IGF-I mRNA an, die stärkste Expression findet zwischen 4 und 16 Stunden nach GH-Gabe statt (206). IGF-I besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit IGF-II und Insulin. IGF-II besteht aus 67 Aminosäuren und wird durch ein 30kb-Gen auf Chromosom 11 exprimiert, seine Homologie zu IGF-I beträgt 60 %. Zwei IGF-Rezeptoren vermitteln die Wirkung der IGFs. Der IGF-I-Rezeptor bindet mit größter Affinität IGF-I, aber auch IGF-II (ca. zehnmals geringere Affinität) und Insulin (hundert- bis tausendfach geringere Affinität). Er besitzt eine starke Strukturhomologie zum Insulinrezeptor. Der IGF-II-Rezeptor bindet mit höchster Affinität IGF-II, IGF-I mit ca. fünfhundertmal geringerer Affinität und kein Insulin. Die meisten Effekte von IGF-I und IGF-II scheinen über den IGF-I-Rezeptor vermittelt zu werden (207). Die Wirkung von IGF wird durch IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) moduliert, wovon derzeit 6 verschiedene bekannt sind, ihre Wirkmechanismen aber nur teilweise (208). IGFBP-1 scheint als Inhibitor von IGF-I zu wirken ebenso wie auch IGFBP-4; IGFBP-2 ist ein wichtiges Bindungsprotein für IGF-II, sein Spiegel steigt bei Stresszuständen an (209-211). 80-85 % des zirkulierenden IGF-I sind an IGFBP-3 gebunden, in Verbindung mit einem Glykoprotein - der sogenannten säu-

relabilen Untereinheit (*acid labile subunit* bzw. ALS) - bilden sie einen Komplex, der als intravaskulärer IGF-I Speicher dient. IGFBP-3 verstärkt den anabolen Effekt der IGFs durch Verlängerung ihrer Halbwertszeit und eine Verstärkerschleife (212). Die Bildung von IGFBP-3 wird ebenfalls von GH stimuliert (213). IGFBP-5 bindet vorwiegend IGF-II, es zeigt intrinsische mitogene Aktivität und bindet außerdem sehr fest an Hydroxylapatit (214). IGFBP-6 zeigt als einziges Bindungsprotein eine höhere Affinität zu IGF-II als zu IGF-I (215).

#### **1.2.3.4 Rückkopplungsmechanismus**

Die GHRH-Freisetzung wird durch Hypoglykämie, Glukagon, Vasopressin,  $\alpha$ 2-Agonisten und Glukokortikoide gesteigert. Eine hyperglykämische Stoffwechselsituation hemmt die Freisetzung. GH selbst hemmt die GHRH-Ausschüttung und möglicherweise auf autokrinem Wege die  $\alpha$ -Zellen (kurze Feedbackschleife). Des weiteren besteht ein negativer Feedbackmechanismus über IGF, d.h. durch erhöhte Serum-IGF-Werte werden die  $\alpha$ -Zellen gehemmt und die Somatostatinfreisetzung stimuliert und somit die GH-Sekretion gesenkt (lange Feedbackschleife).

#### **1.2.4 Interaktion mit Stoffwechselmechanismen**

Wachstumshormon beeinflusst sowohl den Energie- als auch den Eiweißstoffwechsel. Es hat einen diabetogenen Effekt. Fettsäuren werden freigesetzt. Die Erhöhung von freien Fettsäuren (FFAs) und Glukose wird auch als antikataboler Effekt bezeichnet. GH hat einen anabolen Effekt, die Stickstoffausscheidung nimmt ab.

##### **1.2.4.1 Zuckerstoffwechsel**

GH zeigt komplexe Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel. Es spielt eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Serumglukosespiegel. So verursacht Glukosegabe zunächst einen Abfall des GH-Spiegels, der nach 3-5 Stunden wieder ansteigt (216). Exogen appliziertes GH wirkt anfangs insulinähnlich und insulinunabhängig blutzuckersenkend (217). Die Glukoseoxidation wird zuerst gesteigert, nach ca. 1 Stunde aber gesenkt. Desweiteren wirkt GH direkt auf die Inselzellen des Pankreas und führt so zu einer erhöhten Insulinsekretion. Die periphere Insulinsensibilität wird durch GH gesenkt, der Glukosetransport in die Zellen vermindert. Insgesamt senkt GH die Glukosetoleranz, so dass es unter GH-Therapie zu Hyperglykämie auf dem Boden einer Insulinresistenz kommen kann (218). Diese Effekte sind einer direkten GH-Wirkung zuzu-

schreiben, da sie bereits in den ersten Stunden nach GH-Gabe auftreten, ein Anstieg des IGF-I Spiegels aber erst nach 3-6 Stunden erfolgt. IGF-I steigert den Transport von Glukose in die Zellen (219).

#### **1.2.4.2 Fettstoffwechsel**

Im Fettstoffwechsel zeigt GH hauptsächlich lipolytische Wirkung, so steigen nach einer kurzen Phase niedriger FFA-Spiegel nach GH-Gabe die Triglyzeride und FFAs an (220). IGF-I dagegen wirkt insulinähnlich, d.h. es steigert die Lipogenese und hemmt die Lipolyse. FFA hemmen die GH-Sekretion (221).

#### **1.2.4.3 Eiweißstoffwechsel**

Im Proteinstoffwechsel steigert GH die Proteinsynthese und den Transport von Aminosäuren in die Zellen weitgehend ohne Beeinflussung der Proteolyse (222). Es scheint vielmehr den antiproteolytischen Effekt von Insulin zu antagonisieren (223). IGF-I reduziert die Proteolyse und die Proteinoxidation und steigert ebenfalls die Aufnahme der Aminosäuren in die Zellen, es hat aber nur geringe Auswirkungen auf die Proteinsynthese (219).

#### **1.2.4.4 Calciumstoffwechsel**

Über IGF-I und eine Erhöhung des Parathormonspiegels steigert GH die Hydroxylierung von 25-Hydroxy-Cholecalciferol zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Dadurch nimmt die intestinale Calcium- und Phosphatresorption zu (224).

### **1.2.5 Herstellung und Verfügbarkeit**

Zunächst standen für klinische und experimentelle Anwendungen nur sehr geringe Mengen an Wachstumshormon zur Verfügung, die aus menschlichen Hypophysen stammten, welche post mortem entnommen und auf verschiedene Weise aufgearbeitet wurden (225-227). Dabei konnte oft keine genaue Angabe über die Konzentration des Extraktes gemacht werden. 1979 wurde zuerst biosynthetisch hergestelltes Methionyl-h-GH vorgestellt, dessen Wirksamkeit 1982 bestätigt werden konnte (228,229). Seit 1986 ist rekombinantes humanes GH kommerziell erhältlich.



## **1.2.6 Anwendung in der Medizin**

### **1.2.6.1 *Klinische Anwendung***

1958 wurde das Hormon erstmals erfolgreich bei einer durch eine Wachstumshormonsekretionsstörung bedingten Wachstumsstörung angewandt (148). Bei Kindern mit Wachstumshormonmangel ist eine Therapie mit GH heute Goldstandard (230). Eine Indikation besteht auch beim Ullrich-Turner-Syndrom, wobei allerdings höhere Dosen notwendig sind (231).

### **1.2.6.2 *Experimentelle Anwendung***

Experimentell wird Wachstumshormon bei Wachstumsstörungen in Zusammenhang mit Niereninsuffizienz, intrauteriner Wachstumsverzögerung mit bleibendem Minderwuchs und Minderwuchs unter Glukokortikoidbehandlung angewandt (232-234). Bei Erwachsenen mit und ohne Wachstumshormonmangel konnten erhöhte Muskelmasse, vermindertes Fettgewebe und eine Verbesserung der Lebensqualität durch GH-Gabe gezeigt werden (235,236). Experimentell wird GH bei kachektischen Zuständen zusätzlich zur parenteralen Ernährung verabreicht (237). Klinische Untersuchungen zur Wirkung von GH bei chirurgischen Patienten, Verbrennungspatienten und anderen katabolen Zuständen werden durchgeführt (238). Eine Verbesserung der Stickstoffbilanz konnte gezeigt werden (239-242). Durch GH konnte keine Besserung der Muskelaktivität bei Duchenne-Muskelatrophie erreicht werden (243). Wundheilung und Frakturheilung können durch GH gefördert werden (s. 1.2.6.3). Bei Rindern wird GH bereits zur Steigerung der Milchproduktion verwendet (244). Auch bei laktierenden Frauen zeigt es positive Effekte, ein Einsatz bei Hypogalaktie scheint daher sinnvoll zu sein. In der Milch sind keine erhöhten GH- oder IGF-Konzentrationen nachweisbar (245). GH scheint auch die Ovulation unter Gestagentherapie bei subfertilen Frauen günstig zu beeinflussen (246). Bis jetzt gibt es keine Daten, die eindeutig für eine GH-Therapie bei Adipositas oder Osteoporose sprechen (242).

### **1.2.6.3 *Wund- und Frakturheilung***

GH hat aufgrund seiner anabolen Eigenschaften und der IGF-I vermittelten proliferationsfördernden Wirkung sowie der Stimulierung der lokalen Synthese von Wachstumsfaktoren günstige Auswirkungen auf die Wundheilung (247). Es wurde an Verbrennungspatienten gezeigt, dass durch GH-Therapie Spenderheilungszeiten bei Haut-

transplantationen signifikant verkürzt werden konnten (248,249). Trotz teurer Therapie konnten so aufgrund verkürzter Liegezeiten die Behandlungskosten gesenkt werden (250). An den Spenderhautstellen kommt es zu beschleunigter Basallaminabildung sowie einer gesteigerten Expression von IGF-I-Rezeptoren und erhöhten Anteilen von Laminin, Kollagen IV und VII und Cytokeratin-14 (251). Positive Auswirkungen auf die Immunantwort wurden beschrieben, wie eine Verbesserung des CD4/CD8-Verhältnisses oder eine Verringerung der Inzidenz der Wundinfektion, diese lassen sich aber noch nicht endgültig bestätigen (252,253).

Der gesteigerte Energieverbrauch nach Trauma ist abhängig von Art und Ausmaß der Verletzung und wird durch Mobilisation von Energie- und Proteinspeichern gedeckt. Da dies zu lebensbedrohlichen Zuständen führen kann, versucht man das anabole Potential des GH zur Behandlung zu nutzen. Nach Traumata verändert sich der pulsatile Charakter der GH-Sekretion. Direkt nach dem Trauma werden die höchsten GH-Spiegel gemessen, dann reduziert sich die Pulsfrequenz, bzw. ist ganz aufgehoben zugunsten basal erhöhter GH-Spiegel (254,255). Obwohl der GH-Spiegel nach einem Trauma ansteigt, fällt der IGF-I-Spiegel bis zum 4. postoperativen Tag ab und steigt bis zum 6. Tag wieder auf Normalwerte an. IGFBP-3 zeigt einen ähnlichen Verlauf wie IGF-I, IGFBP-1-Spiegel steigen dagegen an. Dies impliziert, dass es unter Stress von einer insulinähnlichen, IGF-I-vermittelten, anabolen Wirkung der GH/IGF-I-Achse zu einer GH-vermittelten Antiinsulinwirkung mit gesteigerter Lipolyse, Proteolyse und Glukoseintoleranz kommt (256). GH-Therapiestudien bei Traumapatienten ebenso wie bei Sepsispatienten und Verbrennungspatienten zeigen keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich des Proteinmetabolismus (257,258). In verschiedenen Studien wurde ein fördernder Einfluss auf die Frakturheilung sowohl biomechanisch als auch histologisch und radiologisch gezeigt (259-261). Dabei kam nur z.T. speziesspezifisches Wachstumshormon zur Anwendung (261-263).

#### **1.2.6.4 Missbrauch und unerwünschte Wirkung**

Wachstumshormon findet illegale Verwendung als Dopingmittel aufgrund seiner positiven Wirkung auf die Muskelmasse (236). Zu den Komplikationen und unerwünschten Wirkungen einer GH-Therapie zählen Hyperglykämie und Insulinresistenz, Salz-Wasser-Retention und Hypertension, Hypercalciämie, die Manifestation latenter Hypothyreosen, Hüftkopfeiphysenlösung, Arthralgien, erhöhte Inzidenz des Karpal-Tunnel-Syndroms und andere Akromegaliezeichen, Antikörperbildung und Leukämie (264,265).

Hyperglykämie und Insulinresistenz werden durch einen veränderten Glukosetransport verursacht (266). Die Wasserretention beruht vermutlich auf einer Umverteilung von Wasser von extra- nach intrazellulär durch GH-Gabe, welche sich allerdings nach einiger Zeit normalisiert (267). Die Hypercalciämie zeigt, dass GH offensichtlich den Calciumstoffwechsel beeinflusst, der Mechanismus ist allerdings noch nicht geklärt, auch zeigten die Patienten keine Hypercalciämiesymptome (224). Früher kam es aufgrund verschiedener Verunreinigungen der Hormonpräparate häufig zu Antikörperbildung und allergischen Reaktionen, was allerdings durch die Gabe von rekombinant hergestelltem GH weitgehend überwunden ist, ebenso wie die Gefahr der Übertragung der Jakob-Creutzfeld-Krankheit durch das aus Hypophysen gewonnene Hormon (268). Es gibt bis jetzt keine Daten, die ein erhöhtes Malignom- oder Leukämierisiko aufgrund einer GH-Therapie nachweisen, es finden sich allerdings GH- und IGF-Rezeptoren auf normalen Knochenmarkzellen und leukämischen Lymphoblasten in vitro (269,270).

### **1.3 Interaktion von Wachstumshormon und Knochen**

Die Rolle des Wachstumshormons bei der Regulation des Knochenstoffwechsels beim Menschen ist erst seit kurzem bekannt. Es spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum der langen Röhrenknochen (185). Eine Erhöhung der Knochenmasse infolge von Knochenneubildung durch GH-Gabe wurde zuerst an Hunden nachgewiesen (271).

#### **1.3.1 Wirkung auf die verschiedenen Zellen**

Mehrere Hormone wie z.B. Thyroxin, Parathormon und Kortisol sind für das Knochenwachstum von Bedeutung, aber am wichtigsten für normales Wachstum ist GH. Es ist gezeigt worden, dass GH das Wachstum von Knorpel und anderen Geweben durch Erhöhung der Zellzahl und nicht durch Erhöhung der Zellgröße stimuliert (274).

##### **1.3.1.1 Osteoblasten**

In verschiedenen Zellkulturen wurde nachgewiesen, dass GH Osteoblasten direkt stimuliert (272-276). Einige Studien zeigten, dass GH auch für Osteoblasten phänotypische Funktionen stimuliert, wie die Bildung von alkalischer Phosphatase (AP), Osteocalcin und Kollagen Typ I (272,276-278). Auf Osteoblasten konnten spezifische GH-Rezeptoren mit hoher Affinität nachgewiesen werden (279). GH stimuliert die Synthese von IGFs in Osteoblasten (272), wobei die relativen Mengen von gebildetem IGF-I und IGF-II verschieden sind. IGFs zeigen anabole Effekte an Osteoblasten. IGF-II wird von

Nager- und Menschenosteoblasten exprimiert, IGF-I wird von Nagerosteoblasten gebildet, bei menschlichen Osteoblasten gibt es gegensätzliche Resultate. IGF-II wirkt in den frühen Stadien der Knorpelbildung des Längenwachstums an der Wachstumsfuge. IGF-I wirkt eher während der später stattfindenden Knochenformation und scheint nicht mit der Wachstumsfuge assoziiert zu sein (273,280-284).

#### **1.3.1.2 Osteoklasten**

GH reguliert die Bildung der Osteoklasten, bis jetzt wurden allerdings sowohl stimulierende als auch hemmende Mechanismen gezeigt (285,286). Es hemmt einerseits die Osteoklastenbildung IGF-unabhängig, andererseits erhöht es die Zahl der Osteoklasten und fördert direkt die Differenzierung und indirekt die Aktivität der Zellen über Faktoren wie IGF-I und Interleukin 6 (286,287). Osteoklasten besitzen IGF-Rezeptoren (288). Auch über Osteoblasten wird die durch IGF-I stimulierte Bildung und Aktivierung von Osteoklasten vermittelt (289).

#### **1.3.2 Wirkung auf den Umbau**

Mehrere in vivo und in vitro Studien haben die wichtige Rolle des GHs bei der Knochenresorption und -formation gezeigt (166,198,279). Die Aktivierung des Umbaus geschieht möglicherweise über GH-Rezeptoren auf Osteoklasten, bzw. über einen Einfluss des GHs auf die Osteoklastenentstehung im Knochenmark, wodurch die Resorption aktiviert wird (285). Die Steigerung der Knochenbildung durch GH in Form einer verstärkten Matrixsynthese erfolgt einerseits direkt über GH-Rezeptoren auf Osteoblasten, andererseits über die Induktion der Bildung von endokrinem wie auch para- und autokrinem IGF-I (272,275). Die hohen Konzentrationen an IGFs in der Knochenmatrix führten zu der Hypothese, dass IGFs an der Kopplung zwischen Resorption und Formation maßgeblich beteiligt sind (290). Die Bioaktivität von IGFs in Knochengewebe wird hauptsächlich durch IGFBPs 3,4 und 5 moduliert (291). Der IGFBP-3/IGF-I-Komplex stimuliert das kortikale Knochenwachstum ovariectomierter Ratten stärker als IGF-I allein (292). IGFBP-3 wird von Osteoblasten produziert, wobei GH dessen Produktion erhöht (293). IGFBP-4 wurde zuerst als hemmendes Protein aus Knochen isoliert (210). GH senkt die Konzentration von IGFBP-4 in Osteoblasten (294). IGFBP-5 stimuliert die Osteoblastenproliferation (295). IGFBP-5 mRNA verdoppelte sich durch GH-Behandlung (277). Diese Fakten weisen auf eine GH-vermittelte Regulation der

IGFBPs hin, welche potentiell eine regulierende Rolle beim Knochenmetabolismus spielen.

GH-Mangel resultiert in einer verminderten Knochenmasse sowohl beim Menschen als auch beim Versuchstier (296-298). Langzeitbehandlung von Patienten mit Wachstumshormonmangel mit GH erhöht die Knochenmasse (299). GH-Behandlung erhöht die Knochenmasse und -steifigkeit bei Ratten mit normaler eigener GH-Sekretion (300,301). Verschiedene Studien haben demonstriert, dass GH bei Personen mit normaler GH-Sekretion sowohl Marker für Knochenformation als auch -resorption erhöht. Dies geschieht sowohl bei gesunden jungen Männern als auch bei osteopenischen postmenopausalen Frauen. Aufgrund der kurzen Behandlungsdauer gibt es aber keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Knochenmasse (302,303). Osteoporotische Patienten zeigen dabei ein ähnliches Ansprechen auf die GH-Therapie wie Gesunde (304). In einer sehr kleinen Studie wurde an 3 osteoporotischen Patienten histomorphometrisch eine erhöhte periostale Knochenbildung durch GH-Behandlung gezeigt (305).

Da eine GH-Behandlung auch bei Patienten mit Wachstumshormonmangel zunächst zu einer gesteigerten Knochenresorption führt, allerdings bei insgesamt erhöhter Umbaurate, später jedoch durch die vermehrte Knochenbildung eine erhöhte Knochenmasse zu finden ist, gehen einige Arbeitsgruppen vom sogenannten „biphasischen Modell“ der GH-Wirkung auf den Knochenumbau aus (306,307). Dieses besagt, dass zu Beginn der GH-Wirkung die Knochenresorption überwiegt, was zu einem Verlust an Knochenmasse führt. Durch die Resorption wird aber auch die Formation stimuliert, wodurch sich der Knochen dann in einer Phase des verstärkten Gesamtumbaus befindet (307). Therapiert man ausreichend lange, überwiegt schließlich die Knochenbildung. Nachdem die durch gesteigerte Resorption fehlende Knochensubstanz ersetzt ist, kommt es schließlich zu einem Nettogewinn an Knochenmasse. Nimmt man alle klinischen Studien an Patienten mit Wachstumshormonmangel zusammen, so scheint der Umkehrpunkt bei ca. 6 Monaten zu liegen, eine Nettozunahme der Knochenmasse ist dann aber erst nach 12-18 Monaten zu erwarten. Ob dies auch für Personen mit normaler GH-Sekretion gilt, ist noch zu untersuchen (308).

### **1.3.3 Unterschiedliche Einflüsse von GH und IGF**

Entsprechend der ursprünglichen Somatomedintheorie stimuliert GH das Skelettwachstum durch die Steigerung der Produktion von IGF in der Leber, welcher dann auf endokrinem Wege das Knochenwachstum anregt. Zu Beginn der 80er Jahre zeigte eine

Studie, dass die Injektion von GH in die Epiphysenfuge das Wachstum direkt beschleunigt (185). Durch zahlreiche Bestätigungen dieses Ergebnisses ist jetzt akzeptiert, dass GH das Wachstum verschiedener Gewebe direkt stimuliert (186-189).

GH beeinflusst das longitudinale Knochenwachstum direkt sowie auch die lokale Produktion von IGF-I durch die vermehrte Transkription des IGF-I Gens (309). GH hat einen direkten stimulierenden Effekt auf das Wachstum von Prächondrozyten (187,310). Diesem Vorgang folgt die klonale Expansion, die sowohl durch die lokale GH-induzierte Produktion von IGF-I als auch die GH-vermittelte Erhöhung der systemischen IGF-I Werte gefördert wird (187). GH ist der Hauptfaktor bei der Stimulation von Vorläuferzellen, obwohl IGF dort möglicherweise ebenfalls einen aktivierenden Effekt zeigt (311).

Auch IGF spielt eine wichtige Rolle beim normalen Wachstum, was die schweren Wachstumsstörungen durch IGF-Mangel bzw. IGF-Rezeptor-Mangel verdeutlichen (312). Ob allerdings endokrin wirksames IGF oder lokales, d.h. auto- oder parakrines IGF, von größerer Bedeutung für das normale Wachstum ist, konnte bisher durch Experimente nicht geklärt werden (280). Studien haben gezeigt, dass die systemische Applikation von IGF-I das longitudinale Knochenwachstum stimuliert und ebenso das Körpergewicht erhöht (313). Der Effekt von systemischem IGF-I auf nichtskelettales Gewebe ist dabei sogar stärker als der auf das Skelett (314).

### **1.3.4 Hypophysärer Gigantismus und Akromegalie**

Die klassischen durch GH-Hypersekretion entstehenden Krankheitsbilder werden nach Einsetzen der vermehrten Ausschüttung vor Epiphysenfugenschluss als hypophysärer Gigantismus und nach dem Schluss der Wachstumsfugen als Akromegalie bezeichnet. Das aktive Stadium der Akromegalie geht immer mit einem erhöhten Knochenumbau einher (315). Bei Patienten mit Akromegalie wurden im Vergleich zu gesunden Patienten eine zweifach erhöhte Osteocalcinkonzentration im Serum und eine dreifach gesteigerte Hydroxyprolinausscheidung im Urin festgestellt (316). Die Serumkonzentration von Osteocalcin korreliert mit den Konzentrationen von GH und IGF, durch Behandlung normalisieren sich die Werte von Osteocalcin und Hydroxyprolin (317). Beeinflussende Faktoren wie gleichzeitig auftretender und zum Teil auch wachstumshormonbedingter Hypogonadismus verschleiern häufig die reinen Effekte der Akromegalie, so dass man früher auch annahm, Akromegalie sei eine Ursache für Osteoporose (318). Es wurden mit verschiedenen Methoden sowohl erniedrigte als auch erhöhte Knochendichte in der

Lendenwirbelsäule gezeigt (319,320). Eine andere Studie zeigte eine erhöhte kortikale Knochendichte am Femur, aber eine normale an der Lendenwirbelsäule (316). Hingegen ergaben histomorphometrische Untersuchungen an Beckenkammbiopsien erhöhte Knochenmasse sowohl am kortikalen wie auch am spongiösen Knochen (315). Die meisten Studien weisen eine erhöhte kortikale Knochenmasse nach, der spongiöse Knochen scheint größtenteils unverändert zu bleiben (166,278,315,316,318,320,321).

### **1.3.5 Bisherige Studien**

Viele Untersuchungen zur GH-Wirkung wurden an hypophysektomierten Tieren vorgenommen. Die durch die Hypophysenentfernung entstandenen Veränderungen am Knochen wie gesunkenes Knochenvolumen, gesunkene Trabekelzahl, verringerte Trabekeldicke, verringerte Knochenbildung, erhöhte Knochenresorption, erniedrigtes Osteocalcin, erniedrigtes  $\alpha 1(I)$ -Prokollagen können durch GH verringert werden (298,322). Kontroverse Resultate der GH-Wirkung auf die Knochenresorption bei hypophysektomierten Tieren entstehen möglicherweise dadurch, dass durch die Hypophysektomie auch andere Hormone vermindert sind (323,324). Deshalb erscheint es sinnvoll, wachstumshormondefiziente Tiere zu verwenden, deren übrige Hypophysenhormone im Normbereich liegen. Studien an diesen Tieren haben die Beobachtungen an hypophysektomierten Tieren bestätigt, dass GH Knochenmasse und Knochenbildung erhöht (325-327).

Für Experimente zur Wirkung von exogenem GH bei normaler endogener GH-Produktion wurden meist Ratten verwendet, wobei das Problem besteht, dass die Epiphysenfugen bei diesen Tieren erst in einem sehr hohen Alter verschlossen sind, so dass meist auch ein lineares Knochenwachstum die Ergebnisse beeinflusste (301,328). Da bei Ratten nicht sicher zwischen Knochenaufbau und -umbau differenziert werden kann, müssen diese Ergebnisse mit Untersuchungen an Tieren verglichen werden, bei denen die Epiphysenfugen nach der Pubertät geschlossen sind (271,329,330). GH-Gabe erhöht die Knochenmasse bei normalen Ratten. Durch Tetrazyklinmarkierung konnte gezeigt werden, dass GH die subperiostale Knochenbildung induziert, ohne die endostale Oberfläche zu beeinflussen (300,301,327). Der neu gebildete Knochen blieb nach der Behandlung erhalten (301). Es sind sowohl Knochenmasse als auch mechanische Stabilität des Knochens erhöht gewesen, und die mechanische Qualität war beinahe die gleiche wie in den Kontrollgruppen (300,301,331).

Bei der GH-induzierten subperiostalen Knochenbildung wurden regionale Unterschiede beobachtet. So fand Knochenanbau an den Außenflächen lumbaler Wirbel statt, nicht jedoch im Bereich des Spinalkanals (328). GH verursacht die Bildung von Hohlräumen in der Kortikalis des Wirbelkörpers im Gegensatz zum diaphysären kortikalen Knochen (328,332). In allen genannten Experimenten nahmen die Ratten an Gewicht zu. Die GH-Gabe hatte in diesen Studien keine quantifizierbare Wirkung auf den trabekulären Knochen, da sich weder das Knochenvolumen noch die Oberfläche pro Volumen veränderten (328). Untersuchungen an Primaten haben ebenfalls eine Erhöhung der Knochendichte sowie der Knochenneubildung gezeigt. Die Wirkung zeigte sich an kortikalen Knochen wie Tibia und Femur, an vorwiegend spongiösen Wirbeln hingegen konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden. Zusätzliche IGF-I Gabe zeigte keine Steigerung dieses Effekts (330).

#### **1.4 Polychrome Sequenzmarkierung**

Leuchten Stoffe auf, wenn ihnen Energie zugeführt wird, so bezeichnet man dies als Lumineszenz. Hört die Leuchterscheinung nach Beendigung der anregenden Strahlung auf, spricht man von Fluoreszenz. Der Name leitet sich vom Fluorit (=Flussspat,  $\text{CaF}_2$ ) ab, welches diese Eigenschaft aufweist. Eine Reihe von organischen und anorganischen Substanzen wie auch Knochen zeigen von Natur aus eine Eigenfluoreszenz, was man auch als Primärfluoreszenz bezeichnet. Lagert man Substanzen, die fluoreszieren, sogenannte Fluorochrome, an andere Strukturen an, die dadurch zum Leuchten gebracht werden, nennt man das Fluorochromierung. Durch die Fluorochromierung entsteht dann eine Sekundärfluoreszenz, die am Knochen viel intensiver ist als dessen Eigenfluoreszenz und damit zu deutlich sichtbaren Spuren führt. Bei Bestrahlung von Fluorochromen mit kurzwelligem UV-Licht werden ihre Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Das Molekül befindet sich dann im angeregten Zustand. Fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, so wird Energie in Form von längerwelligem, energieärmerem Licht frei. Da dieser Vorgang meist in mehreren Schritten stattfindet, resultiert ein nicht monochromatisches Fluoreszenzlicht. Die Wellenlänge des Lichtes verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Frequenz des Lichtes und damit auch zu seiner Energie. Die Energieaufnahme wird dabei als Absorption, die Energieabgabe als Emission bezeichnet. Dieses emittierte Licht kann als Fluoreszenz beobachtet werden. Mit geeigneten Filtern ist es möglich die Fluorochrome mit der richtigen Wellenlänge anzuregen, dem Auge aber nur das emittierte Licht sichtbar



zu machen. Die unterschiedlichen Filter liefern eine optimale Anregung der jeweiligen Farbstoffmoleküle bei weitgehender Ausschaltung störender Überlagerungsfluoreszenzen.

Die besondere Affinität der Fluorochrome zum Knochengewebe erklärt sich aus der Bildung von Calcium-Fluorochrom-Chelaten sowie der festen Bindung an das Hydroxylapatit des Knochens. Für die Fluoreszenzmikroskopie geeignete Fluorochrome zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine hohe Affinität zum Knochen haben, damit man durch eine kurzzeitige Verabreichung der Substanz eine distinkte Markierung erhält und somit eine Momentaufnahme zum jeweiligen Zeitpunkt entsteht. Verabreicht man verschiedene Fluorochrome zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhält man eine polychrome Sequenzmarkierung, die es ermöglicht, anhand der Anordnung der Markierungen Aussagen über örtliche und zeitliche Entwicklung des Knochenan- und -umbaus zu treffen. Fluorochrome werden in der Mineralisationsphase der Knochenbildung in die Knochensubstanz eingelagert. Schreitet die Knochenbildung fort, so wandert die Markierung in die Tiefe. Resorptionszonen sind nur dann markiert erkennbar, wenn die Fluorochrome sich an der osteoklastären Resorptionsfront anlagern, und die Resorption nach diesem Vorgang nicht mehr weiter fortschreitet.

1599 stellte man schon fest, dass neu entstehender Knochen mit dem Extrakt der Krappwurzel angefärbt werden kann, deren Hauptfarbstoff Alizarin ist, welches makroskopisch und in weißem Licht sichtbar ist (333). Die ersten beschriebenen Knochenfluorochrome waren Porphyrine (334). Bereits 1958 wurde beschrieben, dass Tetrazykline<sup>1</sup> sich in verkalkenden Knochen einlagern und im ultravioletten Licht als

---

<sup>1</sup> Tetrazyklin = (4S,4aS,5aS,6S,12aS)-4-Dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octa-hydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthaencarboxamid

gelbe Fluoreszenz sichtbar werden (335). Diese wurden in der Folge nicht nur bei Versuchstieren sondern auch zu diagnostischen Zwecken am Menschen angewandt (336). Neue Fluorochrome wie Calcein, 2,4-bis-[N,N'-di-(Carboxymethyl)-Aminomethyl]-Fluorescein bzw. DCAF, Calceinblau, Alizarinkomplexon und Xylenolorange wurden entdeckt, durch welche die polychrome Fluoreszenzmarkierung ermöglicht wurde (337,338).

An eine Substanz zur Fluorochrommarkierung müssen verschiedene Anforderungen gestellt werden. Die Fluoreszenz soll scharf begrenzt sein und sich von den anderen verwendeten Substanzen möglichst deutlich unterscheiden, der Einfluss auf den Knochenmetabolismus soll möglichst gering sein, außerdem sollte die Substanz allgemein gut verträglich sein. Weiterhin sollte die Substanz weder während der histologischen Weiterverarbeitung beeinträchtigt werden noch durch die Anregung mit ultraviolettem Licht. Werden verschiedene Fluorochrome angewandt, sollte gewährleistet sein, dass alle das gleiche Stadium der Knochenbildung markieren.

Tests zur akuten Toxizität ergaben, dass die toxischen Mengen von Tetrazyklinen, Xylenolorange und Calcein 5-30fach über der zur Markierung benötigten Dosis lagen. Tetrazyklin hat bei Untersuchungen der Wirkung auf das Osteoblastenwachstum in Organkulturen einen relativ stark hemmenden Effekt, die übrigen Substanzen einen weit geringeren, wobei verschiedene Tetrazykline sich verschieden verhalten. In vivo wurde nachgewiesen, dass das Wachstum durch die sequentielle Anwendung der Markierungssubstanzen nicht beeinflusst wird (334).

Durch eine normale Verarbeitungsdauer in Ethanol, Xylol und Methylmetacrylat bleichen Tetrazykline, Xylenolorange und Calcein kaum aus. Durch Bestrahlung mit UV-Licht werden Tetrazykline zu einem gewissen Grad ausgebleicht, Xylenolorange und Calcein sind auch nach mehreren Stunden noch gut sichtbar (339). Das Einbettmedium sollte eine möglichst geringe Eigenfluoreszenz aufweisen. Die Substanzen können intravenös oder subkutan verabreicht werden.

Für eine Dreifachmarkierung schlagen Rahn et al. Xylenolorange, Calcein und Tetrazyklin vor (338). Calcein zeigt von den Substanzen die stärkste Intensität mit zusätzlich starker Resistenz gegen äußere Einflüsse, DCAF verhält sich ähnlich, hat allerdings einen höheren Preis. Xylenol zeigt auch günstige Eigenschaften, muss wegen seiner schwächeren Intensität aber höher dosiert werden. Tetrazykline sind die einzigen beim Menschen anwendbaren Fluorochrome.

## 1.5 Herleitung der Fragestellung

Es ergeben sich aus den oben aufgeführten bisher durchgeführten Studien und den daraus resultierenden Ergebnissen folgende Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden sollen. In dieser Studie soll quantitativ untersucht werden, ob Wachstumshormon den Knochenumbau beim Yucatan-Minischwein erhöht und die Struktur des Knochens verändert. Es gilt die Hypothese zu prüfen, dass die systemische Applikation von Wachstumshormon eine aktivierende Wirkung auf den Knochenumbau hat. Dazu werden einerseits dynamische Knochenparameter am Schwein erhoben wie die Mineralappositionsrate und andererseits statische Parameter wie die Knochendichte und Trabekeldicke. Anhand von aktiven und passiven Resorptions- und Formationsoberflächen der Trabekel sowie der Zellverteilung der knochenproduzierenden und –resorbierenden Zellen auf der Trabekeloberfläche wird ebenfalls eine Aussage über den Knochenstoffwechsel getroffen. Sämtliche Parameter werden an hormon- und placebobehandelten Tieren erhoben.

Um ortsabhängige Differenzen des Knochenumbaus darzustellen, werden an 3 verschiedenen Lokalisationen pro Tier Parameter ermittelt. Die Knochenproben Beckenkamm, Rippe und Wirbelkörper werden dabei aufgrund ihrer diagnostischen bzw. klinischen Relevanz gewählt.

Die Bestimmung der Mineralappositionsrate wird zur Messung eines veränderten kortikalen Knochenumbaus verwendet. Durch eine dreifache Fluoreszenzmarkierung lässt sich hiermit auch die Hypothese prüfen, dass die Distraktionsosteogenese an sich eine systemisch stimulierende Auswirkung auf den Knochenumbau hat.

Es sollen mit den in dieser Studie angewendeten anteilig neuen Messmethoden mit in anderen experimentellen Gruppen ermittelten Größen vergleichbare Werte erhoben werden. Zur Bestätigung der Hypothese, dass porciner Knochen dem humanen sehr ähnlich sei, werden die hier bestimmten Parameter mit in der Literatur genannten Werten für humane Knochenparameter verglichen.

## **2 Untersuchungsgut und Methoden**

Zur Bestimmung des Einflusses von Wachstumshormon und Distraktionsosteogenese auf den Knochenumbau wurden an Knochenbiopsien von Minischweinen verschiedene histologische und histomorphometrische Knochenparameter bestimmt. Der Versuchsablauf wird in diesem Kapitel dargestellt.

### **2.1 Versuchstiere**

Für die Versuche wurden 24 gesunde, geschlechtsreife, weibliche Schweine der Züchtung Yucatan Minipig<sup>®2</sup> mit einem mittleren Alter von 77 Wochen (von 32 bis 116 Wochen) und einem mittleren Körpergewicht von 32,8 kg (23,0 kg - 50,2 kg) zum Operationszeitpunkt verwendet. Alle an den Tieren vorgenommenen Operationen und Untersuchungen wurden mit Erlaubnis der staatlichen Tierschutzbehörden<sup>3</sup> nach Genehmigung des Tierversuchs und Erteilung von Genehmigungen für die Mitarbeiter durchgeführt und durch den Tierschutzbeauftragten überwacht (gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes, Antrag G 0351/95).

Alle Operationen und Untersuchungen wurden in den Räumlichkeiten der tierexperimentellen Forschungsabteilung der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin durchgeführt.

---

<sup>2</sup> Charles River Laboratorien, Paris, Frankreich

<sup>3</sup> Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGeSi)

Das Minischwein wurde aufgrund der relativ großen physiologischen und anatomischen Übereinstimmungen mit dem Menschen bei gleichzeitig gutmütigem Charakter und guter Handhabbarkeit als Versuchstier ausgewählt.

### **2.1.1 Haltung und Nahrung**

Die Tiere wurden während des Experiments freilaufend in Gruppen von 5-6 Schweinen in 16 m<sup>2</sup> großen Ställen mit Betonboden und Stroheinstreu bei einer Raumtemperatur von 20 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 70 % und einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Als Nahrung erhielten sie Alleinfutter für Micro- und Minischweine<sup>4</sup>, wovon 2x täglich pro Schwein 300 g verfüttert wurden. Wasser stand den Tieren über eine Selbsttränke ad libitum zur Verfügung.



---

<sup>4</sup> ssniff Mpig-E, energiereduziert, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

*Abbildung 2.1-1: Yucatan-Minischweine im Stall (111,112,340)***2.1.2 Gruppeneinteilung**

Vor Beginn des Experiments wurden bei allen Tieren durch Blutentnahmen alle 15 min über einen Zeitraum von 6 h basale GH-Spiegel bestimmt. Die Fläche unter der Serumspiegel-Zeit-Kurve wurde berechnet. Die Daten wurden in einer Rangliste geordnet und nach dieser wurden die Tiere gleichmäßig der Therapie- und Kontrollgruppe zugeordnet. Nach dem Operationszeitpunkt wurden sie fortlaufend nummeriert, so dass folgende Einteilung entstand:

*Tabelle 2.1-1: Zuordnung der Tiere zu den Gruppen (n = 12 je Gruppe)*

GH-Gruppe	6,7,12,16,17,18,23,26,28,29,33,34
Kontrollgruppe	8,9,10,13,14,20,21,22,24,25,27,31

Die Tiere der Wachstumshormongruppe und der Kontrollgruppe unterschieden sich nicht bezüglich Alter und Gewicht:

*Tabelle 2.1-2: Alter und Gewicht der Tiere (Median und Spannweiten)*

Gruppe	Alter in Wochen	Gewicht in kg
Wachstumshormon	78 (56-112)	35 (26-42)
Placebo	76 (54-109)	34 (25-40)

### **2.1.3 Operation**

#### **2.1.3.1 Portimplantation**

Zur Applikation von Fluorochromen und erleichterten Blutentnahme wurde den Tieren in Intubationsnarkose ein Port-System<sup>5</sup> in die linke Vena jugularis interna implantiert, welches auch dazu diente bei Bedarf eine intravenöse Sedierung vorzunehmen.

War eine Aspiration durch den Port nicht mehr möglich, wurde zunächst mit Actosolv<sup>®6</sup> eine Lysetherapie eingeleitet, blieb diese erfolglos wurde eine intraoperative Darstellung und Freispülung vorgenommen. Konnte dadurch auch keine Rückläufigkeit erreicht werden, wurde auf der kontralateralen Seite ein neues großlumigeres Portsystem implantiert. Portrevisionen wurden bei den Schweinen 7 (Tag 3), 8 (Tag 17 nach Lysetherapie), 10 (Tag 15 kontralaterale Neuimplantation), 12 (Tag 11), 13 (Tag 2 nach Lysetherapie) durchgeführt.

#### **2.1.3.2 Fixateuroperation**

Die Tiere dieser Studie erhielten alle einen Halbringfixateur, der an der linken Tibia angebracht wurde. Dazu wurden nach üblicher Vorbereitung unter sterilen Kautelen zunächst 1,5 cm Fibula über einen lateralen Hautschnitt reseziert. Die erste 4,5 mm Schanzschraube wurde distal-lateral an der Tibia platziert. Der vormontierte Fixateur wurde daran mit Klemmbacken befestigt und diente als Schablone zum Setzen der

---

<sup>5</sup> Intraport<sup>®</sup> II, Fresenius, Bad Homburg, D oder Vascular Access Port, Access Technologies, Skokie, IL, USA

<sup>6</sup> Human-Urokinase, Behringwerke AG, Marburg

weiteren 3 Schanzschrauben. Die Tibia wurde dann über einen anteromedialen Zugang unter Schonung des Periosts in Diaphysenmitte osteotomiert.

#### **2.1.4 Postoperative Behandlung und Untersuchung**

Die für die Untersuchungen erforderliche Sedierung erfolgte mit Domitor<sup>®7</sup> 2 mg i.m., eine Antagonisierung konnte mit Antisedan<sup>®8</sup> i.m. erzielt werden. Weitere evtl. erforderliche Sedierung erfolgt mittels Boli von 2 ml entsprechend 50 mg Trapanal<sup>®9</sup> i.v. über den Port.

##### **2.1.4.1 Applikation von Wachstumshormon/Placebo**

Die Tiere der Behandlungsgruppe erhielten rekombinantes speziesspezifisches, d.h. porcines Wachstumshormon<sup>10</sup> in einer Dosierung von 100 µg/kg entsprechend 0,5 IE/kg Körpergewicht pro Tag. Die Kontrollgruppe erhielt 1 ml 0,9 prozentige Kochsalzlösung pro Tag. Die Injektionen wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes von 26 Tagen beginnend am Operationstag bis zum Tag der Tötung zwischen 8:00 und 10:00 subkutan in eine markierte retroaurikuläre Hautfalte appliziert.

##### **2.1.4.2 Distraction**

Nach einer postoperativen Latenzzeit von 4 Tagen schloss sich ab Tag 5 eine Distractionsphase von 10 Tagen an, während der 2x1 mm/d im 12-h-Rhythmus distrahiert wurde. Darauf folgte eine ebenfalls 10tägige Konsolidierungsphase.

---

<sup>7</sup> Medetomidin, Orion Corporation, Famos, Finnland

<sup>8</sup> Atipamezolhydrochlorid, Orion Corporation, Famos, Finnland

<sup>9</sup> Thiopental INN, Byk Gulden, Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz

<sup>10</sup> met-pGH, Novo Nordisk A/S Pharma GmbH, Bagsvaerd, Dänemark



#### **2.1.4.3 Schmerzprophylaxe**

Analgesie wurde während der ersten 3 postoperativen Tage durch intramuskuläre Applikation von Finadyne®<sup>11</sup> 1,1 ml/kg Körpergewicht (KG) erreicht. Zum Schutz vor Verletzungen wurden die Fixateure mit einer Plastikhülle überzogen.

#### **2.1.4.4 Temperatur, Gewicht**

Zur Untersuchung wurde das Tier in einen Käfigwagen gebracht. Täglich wurde rektal die Temperatur gemessen. Danach schlossen sich die im folgenden beschriebenen Untersuchungen an. Bei jeder Untersuchung wurde das Schwein in einer Käfigwaage<sup>12</sup> gewogen. Nach der Sedierung wurde das Tier in einer maßangefertigten Hängematte mit 4 Beindurchlässen und 2 Tragstangen ohne Bodenkontakt aufgehängt.

#### **2.1.4.5 Blutentnahme**

Blut wurde an den Tagen 1, 4, 7, 10, 13, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 25 und 26 zwischen 10:00 und 13:00 über den implantierten Port entnommen. Nach der Blutabnahme wurde der Port mit 5 ml heparinisierter NaCl-Lösung einer Konzentration von 100 IE/ml gespült und geblockt.

#### **2.1.4.6 Röntgen, Ultraschall, Steifigkeitsmessung**

An den Tagen 16, 17, 18, 19, 21, 23, 25 wurden konventionelle und digitale Röntgenaufnahmen, Steifigkeitsmessungen und Ultraschalluntersuchungen an den operierten Extremitäten vorgenommen.

---

<sup>11</sup> Flunixin-Meglumin, Berna Veterinärprodukte AG, Bern, Schweiz

<sup>12</sup> Rewa Typ 111, Rewa Waagenfabrik, Mettmann

#### **2.1.4.7 Polychrome Fluoreszenzmarkierung**

Zur polychromen Fluoreszenzmarkierung wurden den Tieren zu definierten Zeitpunkten nach der Blutentnahme intravenös über das implantierte Port-System Fluorochrome verabreicht. 2 Tage postoperativ (Tag 3 im Studienablauf) erhielten sie Calceingrün<sup>13</sup> in einer Dosierung von 15mg/kg KG, am 16. Tag 25mg/kg KG Tetrazyklinhydrochlorid<sup>14</sup> und am 23. Tag 90 mg/kg KG Xylenolorange<sup>15</sup>. Calceingrün wurde zu 1,5 g in 100 ml Aqua dest. gelöst und mittels Natriumhydrogenkarbonat wurde ein physiologischer pH-Wert von 7,4 eingestellt. Tetrazyklin wurde in 0,9 prozentiger Kochsalzlösung nach Herstellerangabe gelöst und gewichtsadaptiert dosiert. Xylenolorange wurde zu 90 g in 100 ml Aqua dest. gelöst, der pH-Wert wie oben beschrieben anschließend eingestellt. Calcein und Xylenol wurden dann durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm in 50 ml Spritzen umgefüllt und im Kühlschrank bei +4°C gelagert.

#### **2.1.5 Tötung und Sektion**

An Tag 26 des Versuchs (d.h. am 25. postoperativen Tag) wurden die Tiere mit 40 ml Trapanal® tief sediert und bei eingetretenem Atemstillstand mit 40 ml 14,9 prozentiger Kaliumchloridlösung<sup>16</sup> getötet. Der 4. Lendenwirbel, die 9. rechte Rippe und ein Teil des Beckenkamms sowie die beiden Tibiae wurden entnommen. Bis auf die Tibiae wurden alle Biopsien sofort nach der Entnahme in Formalinlösung verbracht. An den in isotoner Kochsalzlösung gelagerten Tibiae wurden post mortem CT-Aufnahmen sowie Steifig-

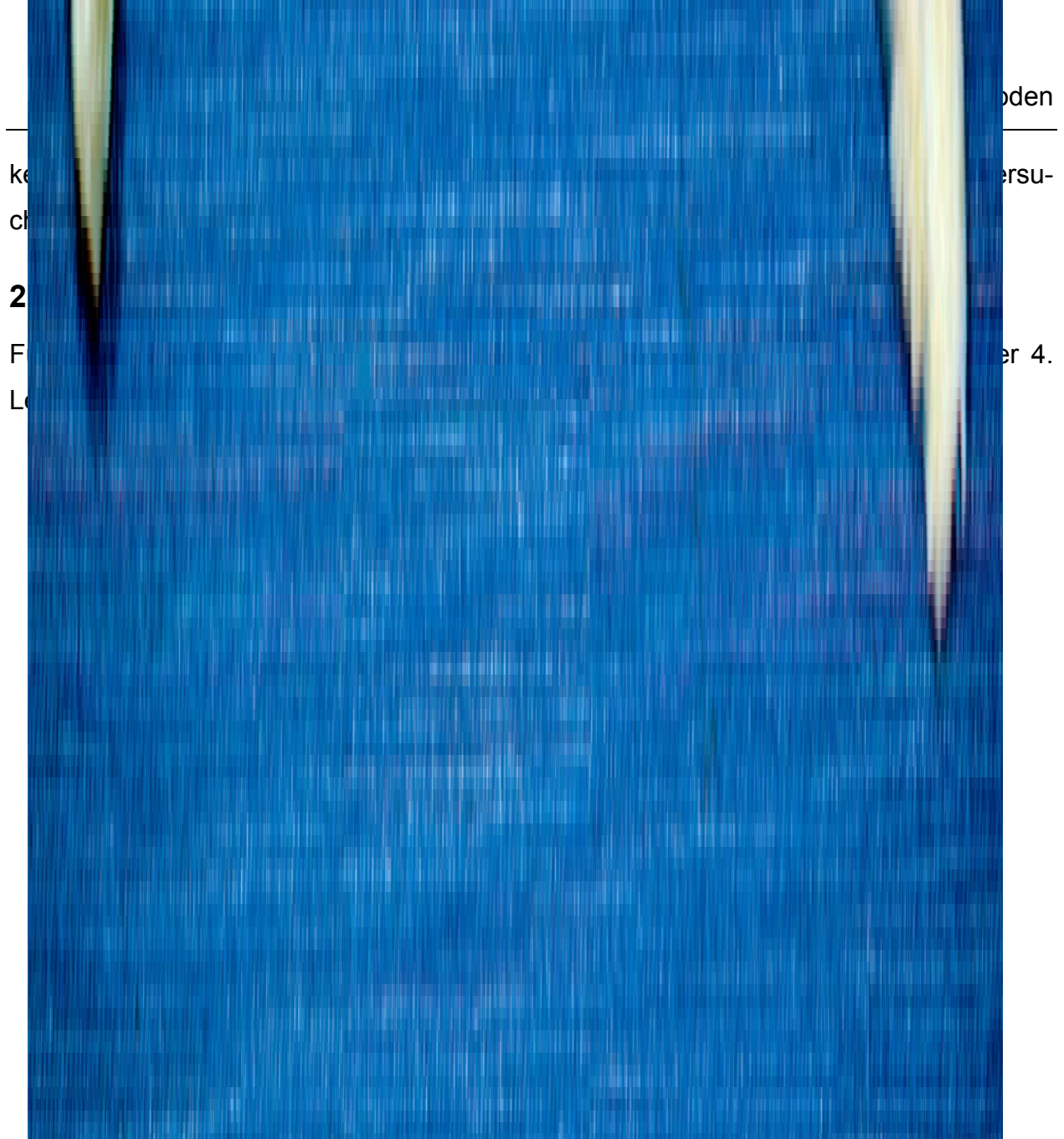
---

<sup>13</sup> C-0875, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

<sup>14</sup> Supramycin® pro infusione, Grünenthal GmbH, Aachen

<sup>15</sup> X-0127, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

<sup>16</sup> KCl 14,9 %, B. Braun, Melsungen



*Abbildung 2.2-1: Knochenbiopsien nach Explantation (von links nach rechts und oben nach unten: Wirbelkörper, Beckenkamm, Rippe)*

Diese Auswahl ergab sich aufgrund der Überlegungen, dass Wirbel eine große klinische Relevanz bei der Auswirkung verschiedenster Knochenerkrankungen und damit verbundenen Umbauvorgängen haben, Iliakalbiopsien sowohl für knochenmorphologische als auch Knochenmarkuntersuchungen diagnostisch relevant sind und Rippen die einzigen Knochen des Achsenskeletts sind, die zur Beurteilung kortikalen Röhrenknochens in Frage kommen.

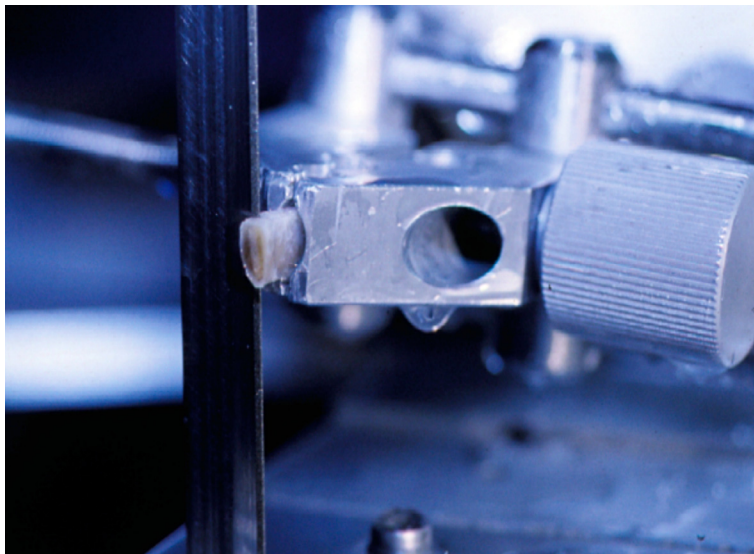
### 2.2.1 Fixierung und Lagerung

Alle Knochen wurden in neutraler isotoner Formaldehyd-Alkohollösung nach Burkhardt<sup>17</sup> nach dem Prinzip der Immersionsfixation fixiert. Die Knochen wurden bis zu Weiterverarbeitung in 80 prozentigem vergälltem Alkohol gelagert.

### 2.2.2 Sägen

Mittels Exakt-Trennschleifsystem-Makro<sup>18</sup> wurden jeweils zwei 3 mm dicke Scheiben aus den Knochen gesägt.

#### 2.2.2.1 Rippen



*Abbildung 2.2-2: Sägen des Rippenknochens (Position R 3)*

---

<sup>17</sup> Für einen Liter: Formalin 36 %ig 324 ml, Ethanol 100 %ig 540 ml, Natrium-Barbital-Puffer 130 ml bei pH=7,4 bestehend aus 58,1 ml Na-Barbital 0,1 molar entspricht 2,06 %ig und 41,9 ml 0,1 normaler Salzsäure

<sup>18</sup> Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt

Die Proben aus den Rippen wurden dorsal 2 cm entfernt vom Kostovertebralgelenk, aus der Mitte der knöchernen Rippe und ventral 2 cm entfernt von der Knorpel-Knochen-Grenze entnommen. Die Benennung der Präparate ist der Abbildung 2.2-3 zu entnehmen. Die jeweils ventral gelegene Knochenprobe wurde für Schliffe, die jeweils dorsal gelegene Probe für Schnitte verwendet. Beim Sägen wurde darauf Wert gelegt, dass das Sägeband immer möglichst orthogonal zur jeweiligen Tangente an die Achse der Rippe geführt wurde.

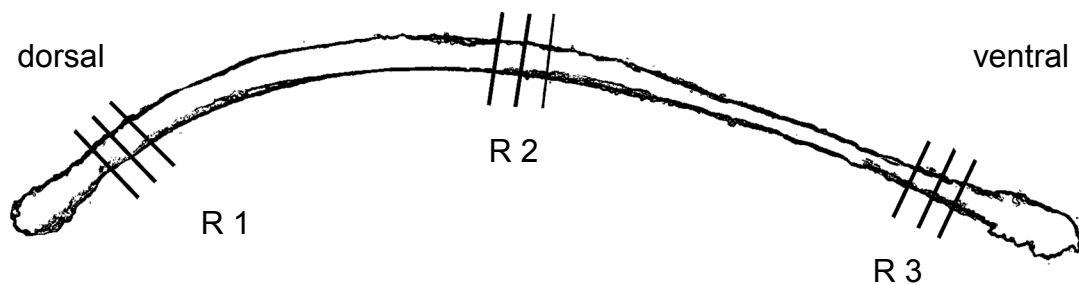


Abbildung 2.2-3: Sägeebenen am Rippenpräparat

#### 2.2.2.2 Wirbel

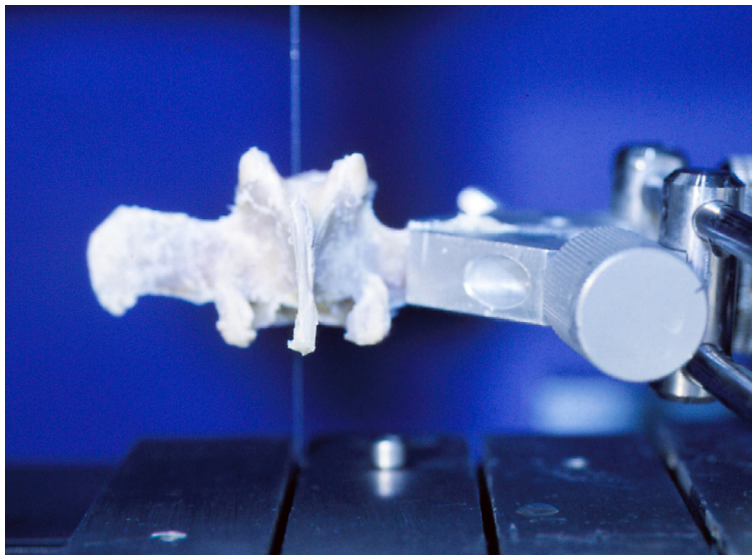


Abbildung 2.2-4: Sägen des Wirbelknochens

Rechts und links von der Mittellinie in kraniokaudaler Richtung durch den Wirbelkörper wurden 3 mm dicke Proben entnommen, die rechte für Schliffe und die linke für Schnitte.

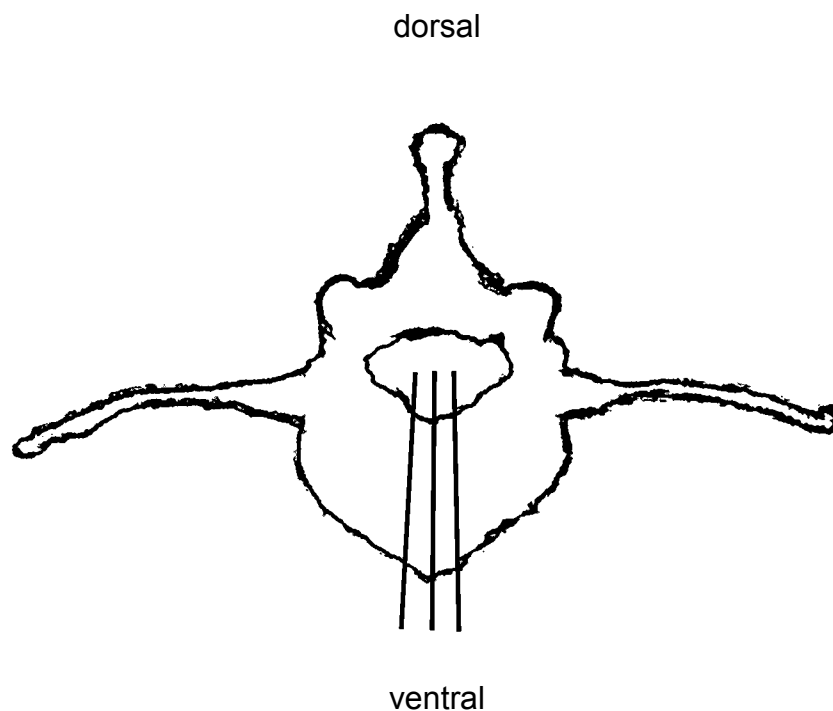


Abbildung 2.2-5: Sägeebenen am Wirbelkörper, Ansicht von vorn

### 2.2.2.3 Beckenkamm

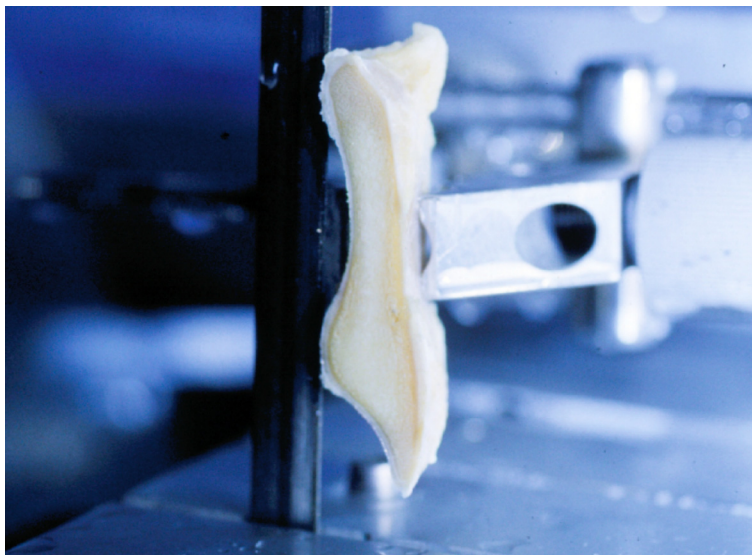


Abbildung 2.2-6: Sägen der Iliakalbiopsie

Die Beckenkammbiopsie wurde 2 cm distal der Crista iliaca, 2 cm distal der Spina iliaca anterior superior rechts entnommen. Die bei der Entnahme entstandene raue Sägefläche wurde verworfen, danach wurden zwei 3 mm dicke Proben parallel zur Crista iliaca

gesägt. Die der Crista näher gelegene Probe wurde für Schnitte verwendet, die andere Probe dementsprechend für Schliffe. Durch diese Schnittführung erhielt man Präparate aus einer Ebene, die der einer Stanzbiopsie vergleichbar ist.

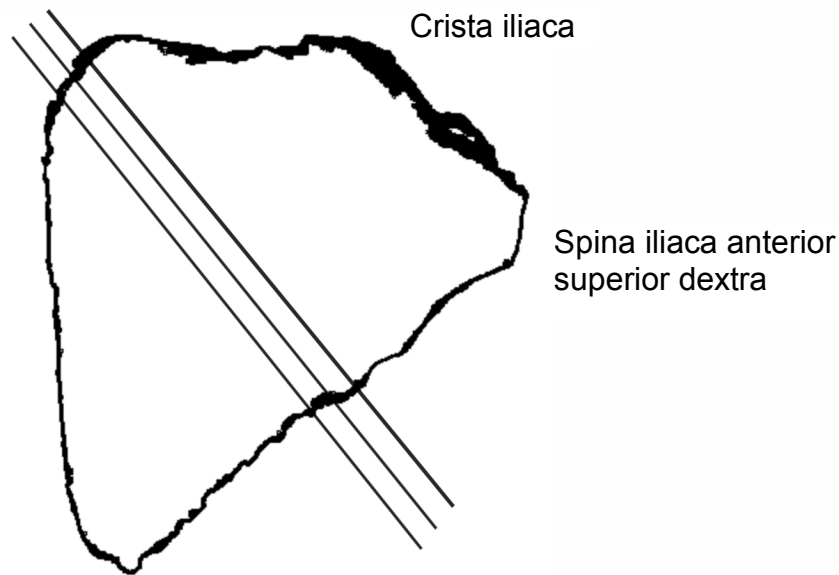


Abbildung 2.2-7: Sä geebenen am Beckenkamm, Ansicht von dorsal

### 2.2.3 Entwässerung und Infiltration

Alle Knochenproben wurden in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, jeweils 24 h in 70, 80, 96 und 100 prozentigem Ethanol und für 24 h in reinem Xylol entfettet. Die Proben wurden dann mit Kunststoffen auf Methylmetacrylatbasis infiltriert. Dabei wurde für Schnittpräparate Technovit 9100<sup>®19</sup> für zweimal eine Woche verwendet. Dieser Kunststoff besteht aus 3 Komponenten, der Basislösung (Methylmetacrylat) zu 94 %, dem Weichmacher zu 5 % und dem Aktivator zu 1 %. Da es bei Temperaturen ab 30 °C

zur Auspolymerisation kommen würde, mussten die Schnittpräparate für die Infiltration im Kühlschrank bei +4 °C gelagert werden. Die Schliffpräparate wurden mit Technovit 7200 VLC<sup>®</sup> ebenfalls für zweimal eine Woche infiltriert. Die gesamte Entwässerung aller Proben und die Infiltration der Dünnschliffpräparate fanden unter Lichtabschluss und zur Beschleunigung der Prozesse auf einem Schüttler<sup>20</sup> bei einer Temperatur von 22 °C und einer Frequenz von 17/min statt.

#### **2.2.4 Polymerisation**

Die Schnittpräparate wurden auf den Boden von ihrer Größe angemessenen Präparategläsern gelegt, nachdem die Gläser zuvor mit Technovit 9100<sup>®</sup> beschichtet worden waren, um ein gleichmäßiges Aufliegen der Präparate zu gewährleisten. Die Seite der Sägefläche wurde nach unten gelegt. Dann wurden die Gläser ca. 1 cm hoch mit frisch angesetztem Technovit 9100<sup>®</sup> gefüllt, luftdicht verschlossen und im Brutschrank<sup>21</sup> bei +37 °C für 24 h auspolymerisiert. Danach wurde zur besseren Weiterverarbeitung der Kunststoffblöcke nochmals Technovit 9100<sup>®</sup> aufgegossen und wieder im Brutschrank auspolymerisiert.

Die Dünnschliffpräparate wurden in Plastikeinbettformen in der Histolux-Einbettungsmaschine luftgekühlt in frischem Technovit 7200 VLC<sup>®</sup>, welches bis zu einer Füllungshöhe von ca. 8 mm in die Einbettformen gefüllt wurde, für 4 h unter Weißlicht vorpolymerisiert, anschließend für ebenfalls 4 h unter Blaulicht nachpolymerisiert.

---

<sup>19</sup> Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim



### 2.2.5 Herstellung von Schliffen

Nach dem Auspolymerisieren wurde der überflüssige Kunststoff mit einer Tischanleifmaschine<sup>22</sup> und Schleifpapier der Körnung P 60 entfernt. Die Präparate wurden dann mit einem 3-Komponenten-Kleber Technovit 4000® auf gereinigte Kunststoffobjektträger<sup>23</sup> aufgebracht, wozu eine Vakuumklebepresse verwendet wurde. Die Objektträger wurden vorher mit einer Mikroschleifmaschine mit Schleifpapier der Körnung P 1200 angeschliffen, um eine bessere Haftung der Präparate zu erzielen. Die aufgeklebten Präparate wurden dann in der Mikroschleifmaschine mit Papier der Körnung P 800 angeschliffen, bis der gesamte Knochen an der Oberfläche lag, danach zur Oberflächen-glättung noch jeweils kurz mit Papier der Körnung P 1000 und P 1200. Die Dicke des aufgeklebten Präparates einschließlich Objektträger wurde mit einer digitalen Bügel-messschraube<sup>24</sup> bestimmt, ebenso die Dicke eines zweiten angeschliffenen Objektträgers. Dieser wurde dann mit Präzisionskleber Technovit VLC 7210® in einer Vakuum-präzisionsklebepresse für 7 min bei Blaulicht aufgebracht. Danach härtete dieses Sandwichpräparat über Nacht aus. Nun wurde mit dem Trennschleifsystem ein ca. 500 µm dickes Schliffpräparat vom Rest des Blockes abgetrennt. Dieses wurde dann mit dem Mikroschleifsystem, welches mit einer digitalen Messvorrichtung Typ AW-10 zur Schliffdickebestimmung verbunden ist, mit Schleifpapier der Körnung P 500, P 800, P 1000, P 1200 auf eine Dicke von ca. 80 µm heruntergeschliffen und schließlich poliert.

---

<sup>20</sup> HS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen

<sup>21</sup> Function Line, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

<sup>22</sup> Phoenix 3000, Fa. Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf

### 2.2.6 Herstellung von Schnitten

Die Blöcke wurden aus den Gläsern gelöst und mit der Tischschleifmaschine mit Schleifpapier der Körnung P 60 angeschliffen, bis der gesamte Knochen in der Sägeebene an der Oberfläche lag. Der so vorbereitete Block wurde dann in das Hartschnittmikrotom<sup>25</sup> mit der vorbereiteten Oberfläche parallel zum Hartmetallmesser<sup>26</sup> eingespannt. Dann wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf mit 0,5 prozentiger Chromalaun-Gelatine<sup>27</sup> beschichtete Glasobjektträger<sup>28</sup> aufgebracht wurden. Diese Präparate wurden dann mit Streckflüssigkeit gestreckt, mit Kisolfolie bedeckt, durch Abrollen mit einem Glasstab von Luftblasen befreit, mit Filterpapier bedeckt und dann in einer Exakt-Klebepresse im Brutschrank bei 37 °C über Nacht getrocknet.

### 2.2.7 Färbungen

Vor der Färbung wurden die Schnitte in 2-Methoxyethylacetat<sup>29</sup> für dreimal 30 min entplastet. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol entfettet, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und schließlich in Aqua dest. gespült. Für die Oberflächenfärbung der Dünnschliffpräparate wurden diese zuerst für 1 min in 1 prozentiger Ameisensäure angeätzt. Nach diesem Prozedere konnte die Färbung erfolgen, wobei sich die

---

<sup>23</sup> Kunststoffobjektträger, Fa. Dia-plus, Walter Messner GmbH, Oststeinbek

<sup>24</sup> Fa. Mitutoyo, Mexiko

<sup>25</sup> Polycut S Heavy duty microtome, Reichert-Jung Cambridge Instr GmbH, Nussloch

<sup>26</sup> 16 cm 40°

folgenden Verfahren für die Färbung unentkalkter Knochenpräparate besonders bewährt haben.

#### **2.2.7.1 Versilberung nach Von-Kossa**

Die seit 1901 bekannte Versilberung nach von Kossa stellt auch heute noch eine sehr spezifische Methode zum Nachweis von kalzifizierter Matrix dar, allerdings wird meist die nach Krutsay modifizierte Methode angewendet (s. Abb. 2.3-2A, Abb. 2.3-3A, Abb. 2.3-5A)(341,342). Sie eignet sich sowohl für die Färbung von Schnitten als auch von Dünnschliffen. Die Färbung weist Calciumphosphat an unentkalkten histologischen Präparaten nach. Der mineralisierte Knochen stellt sich in dieser Färbung schwarz dar, das Osteoid erscheint grau transparent. Die Zellkerne der Osteoblasten, Osteoklasten und Knochenmarkzellen haben eine dunkelgraue Farbe. Die Schnitte wurden für 5 min in 3 %iger wässriger Silbernitratlösung<sup>30</sup> unter Lichtausschluss gefärbt und anschließend gründlich in Aqua dest. gespült. Dann wurde das Silbernitrat für 2 min mit Natriumkarbonat-Formaldehydlösung<sup>31</sup> reduziert. Nun wurde für 10 min in Leitungswasser gespült und dann für 5 min in 5 %igem Natriumthiosulfat<sup>32</sup> gefärbt. Danach wurde erneut für 10 min in Leitungswasser gewässert, mit Aqua dest. gespült, in einer aufstei-

---

<sup>27</sup> Kaliumchrom-III-Sulphat Merck 1036, Gelatine für die Mikrobiologie Merck 4070, Merck, Darmstadt

<sup>28</sup> Menzel Superfrost, Menzel-Gläser Deutschland

<sup>29</sup> Merck 806061, Merck, Darmstadt

genden Alkoholreihe entwässert und mit Xylol entfettet. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte mit xylolhaltigem Vitroclud<sup>®33</sup> und Deckgläschen eingedeckt.

### **2.2.7.2 Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner**

Diese Färbung hat sich für unentkalkte Knochenschnitte bewährt. Goldners 1937 etablierte Trichrom Methode gilt heute als Standardknochenfärbung (s. Abb. 2.2-8, Abb. 2.3-1 A). Dabei färbt sich der mineralisierte Knochen leuchtend grün, das Osteoid erscheint in kräftigem rot. Das Zytoplasma der Osteoblasten und Osteoklasten hat einen orangefarbenen Ton, die Zellkerne erscheinen bräunlich-schwarz, die Erythrozyten orangegelb. Zunächst erfolgte eine Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin<sup>34</sup> für 3 min. Die Schnitte wurden danach unter fließendem Leitungswasser gespült. Dann wurden sie für 5 min in Säurefuchsin-Ponceau<sup>35</sup> gefärbt und anschließend in 1 %iger Essigsäure gespült. Nun erfolgte für ca. 20 min das Differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange G<sup>36</sup> unter mikroskopischer Kontrolle der Entfärbung des Bindegewebes. Es wurde nun wieder in Essigsäure gespült und danach für 8 min mit Lichtgrün<sup>37</sup> gegengefärbt. Danach wurde erneut in Essigsäure gespült, in 3 Portionen absoluten Alkohols

---

<sup>30</sup> Merck 1512, Merck, Darmstadt

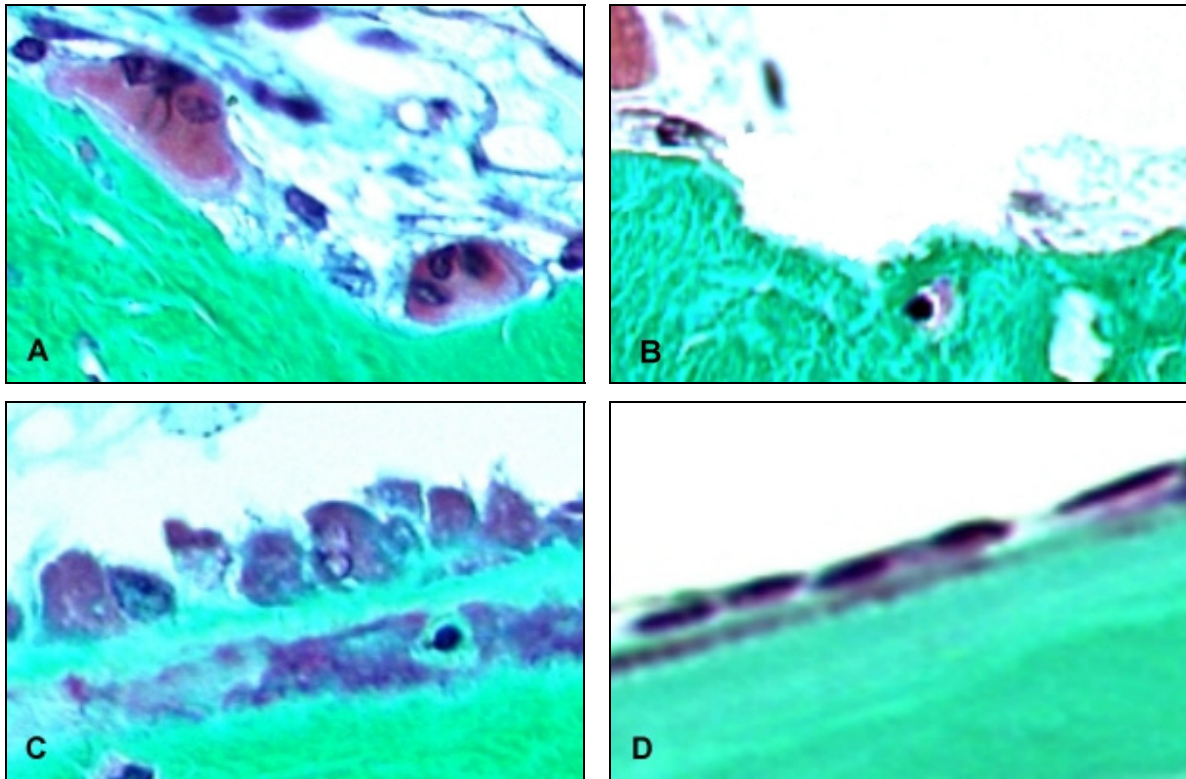
<sup>31</sup> Merck 6392, Merck, Darmstadt

<sup>32</sup> Merck 6516, Merck, Darmstadt

<sup>33</sup> R. Langenbrinck, Emmendingen

<sup>34</sup> zu gleichen Teilen Lösung A 2E 032: 1 g Haematoxylin in 100 ml 95 %igem Alkohol und Lösung B 2E 052: 1,16 g Eisenchlorid  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 g Salzsäure auf 100 ml Aqua dest., Chroma-GmbH & Co., Münster

entwässert, in Xylol entfettet und wie oben beschrieben eingedeckt.



*Abbildung 2.2-8: Trabekeloberflächenstrukturen (A: Osteoklasten, B: Howship Lakune, C: Osteoid mit Osteoblasten, D: Osteoid mit Knochenbelegzellen –lining cells)*

---

<sup>35</sup> 0,4 g Ponceau de Xylidine, 0,1 g saures Fuchsin, 0,6 ml Eisessig, 300 ml Aqua dest.,

## 2.3 Auswertung

### 2.3.1 Bildanalyzesystem

Die Schnitte und Schliffe wurden dann über ein Mikroskop<sup>38</sup> mit Hilfe einer Kamera<sup>39</sup> digitalisiert und in das Bildanalyseprogramm KS 400 3.0<sup>40</sup> eingelesen. Zum Photographieren standen ein Belichtungsautomat<sup>41</sup> sowie eine Kamera<sup>42</sup> zur Verfügung. Für Präparatganzaufnahmen wurde eine Digitalkamera<sup>43</sup> verwendet. Zum Betrachten der Fluoreszenzmarkierungen wurden spezielle Filter benötigt. Da die Fluorochrome unterschiedliche Anregungsbereiche haben, wurden 3 Filtersysteme verwendet, die jeweils aus Anregungsfilter (Bandpassfilter BP), dichromatischem Teilerspiegel (Reflexions-Kurzpassfilter RKP) und Sperrfilter (Langpassfilter LP) bestehen<sup>44</sup>. Durch Umschalten zwischen den Filtern sind alle Markierungen in einem Gesichtsfeld zu beurteilen. Mit dem Bildanalyseprogramm wurden für die jeweilige Fragestellung zuge-

---

Chroma-GmbH, Münster; Merck, Darmstadt

<sup>36</sup> 15 g  $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4\text{xH}_2\text{O}$ , 300 ml Aqua dest., 6 g Orange G, Chroma-GmbH, Münster

<sup>37</sup> 0,9 g Lichtgrün 1B 211, 0,6 ml Eisessig, 300 ml Aqua dest., Chroma-GmbH, Münster

<sup>38</sup> Leica DMRB, Okular: 10x/25 L Plan, Objektive: 1,6x/0,05 Fluotar, 2,5x/0,07 N Plan, 5x/0,12 PL Fluotar, 10x/0,30 PL Fluotar, 20x/0,50 PL Fluotar, 40x/0,70 PL Fluotar, Leica, Bensheim

<sup>39</sup> Sony 3CCD Color Video Camera MC-3254, AC-Adapter AA-P700, Remote Control Unit RM-C950, AVT-Horn

<sup>40</sup> Kontron Elektronik GmbH, Eching

<sup>41</sup> Orthomat E, Leica, Wetzlar

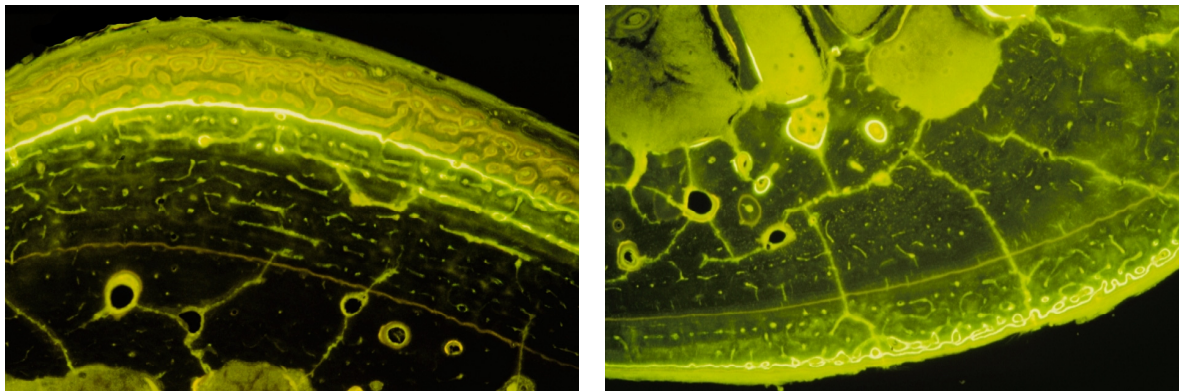
<sup>42</sup> DX 0.32 X, Wild Leitz GmbH

<sup>43</sup> Nikon Coolpix 990, Nikon GmbH, Düsseldorf

schnittene Makros zur Erfassung der Knochenparameter erstellt (s. 0 Anhang), um Aussagen über mögliche Veränderungen der Knochenaktivität und Morphologie treffen zu können, wie sie bei einer Behandlung mit Wachstumshormon erwartet werden.

### 2.3.2 Histologische Beobachtungen

Nach Anfertigung der Schnitte und Schliffe wurden diese zunächst mit bloßem Auge sowie anschließend mit einem Mikroskop betrachtet. Präparate, auf denen die Messungen beeinträchtigende Artefakte erkennbar waren, wurden verworfen und wenn möglich und nötig durch neu angefertigte ersetzt. Digitale Photographien der Strukturen wurden zur Dokumentation angefertigt.



*Abbildung 2.3-1: Knochenanbau ventral (links) und dorsal an Rippendünnschliffen (rechts)*

---

<sup>44</sup> Filterkombinationen I 3 für Calcein (513808 blau BP 450-490 RKP 510 LP 515), D für

### **2.3.3 Statische Histomorphometrie**

Um eine Quantifizierung der knöchernen Veränderungen durch eine systemische GH-Applikation zu erreichen, wurden einerseits strukturelle Parameter wie die Knochendichte und Trabekeldicke, andererseits zelluläre und matrixbedingte Veränderungen an der Knochenoberfläche wie die anteilige Verteilung der einzelnen Zelltypen auf der Trabekeloberfläche gemessen.

#### **2.3.3.1 Mikrostruktur des kortikalen und spongiösen Knochens**

Für die Messungen an Wirbelkörpern und Beckenkämmen wurden von Kossa gefärbte Schnitte verwendet. Da es sich als äußerst ungünstig erwies, Horizontalschnitte der Rippen anzufertigen, weil aufgrund des hohen orthogonal zu schneidenden Kortikalisanteils sehr rissige Präparate entstanden, wurde nach Abschluss der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an den Oberflächen der Schliffpräparate der Rippen eine modifizierte von Kossa Färbung vorgenommen.

Die für die gemessenen und errechneten Parameter verwendeten Abkürzungen entsprechen den Vorschlägen für eine Vereinheitlichung der Nomenklatur von Parfitt (343).

---

Tetrazyklin (513805 violett BP 355-425 RKP 455 LP 470), N 2.1 für Xylenolorange



Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Gesamtpräparatfläche (T.Ar) in mm<sup>2</sup>
- Gesamtknochenfläche (B.Ar) in mm<sup>2</sup>
- Kortikalisfläche (Ct.Ar) in mm<sup>2</sup>
- Kortikale Knochenfläche (Ct.B.Ar) in mm<sup>2</sup>
- Trabekelfläche (Tb.Ar) in mm<sup>2</sup>
- Trabekuläre Knochenfläche (Tb.B.Ar) in mm<sup>2</sup>
- Gesamtknochenanteil in % der Gesamtpräparatfläche (B.Ar/T.Ar) entsprechend der Gesamtknochendichte
- Kortikalisanteil in % der Gesamtpräparatfläche (Ct.Ar/T.Ar)
- Trabekelanteil in % der Gesamtpräparatfläche (Tb.Ar/T.Ar)
- Kortikaler Knochenanteil in % der Kortikalisfläche (Ct.B.Ar/Ct.Ar) entsprechend der kortikalen Knochendichte
- Spongiöser Knochenanteil in % der Trabekelfläche (Tb.B.Ar/Tb.Ar) entsprechend der spongiösen Knochendichte
- Trabekeldicke (Tb.Wi) in µm (an Wirbelkörpern und Beckenkämmen)
- Maximale Präparatlänge (T.Wi.X) in mm (an Wirbelkörpern und Beckenkämmen)
- Maximale Präparatbreite (T.Wi.Y) in mm (an Wirbelkörpern und Beckenkämmen)
- Kortikalisdicke (Ct.Wi) in mm (an Rippenpräparaten)

---

(513812 grün BP 515-560 RKP 580 LP 590), Leica, Bensheim

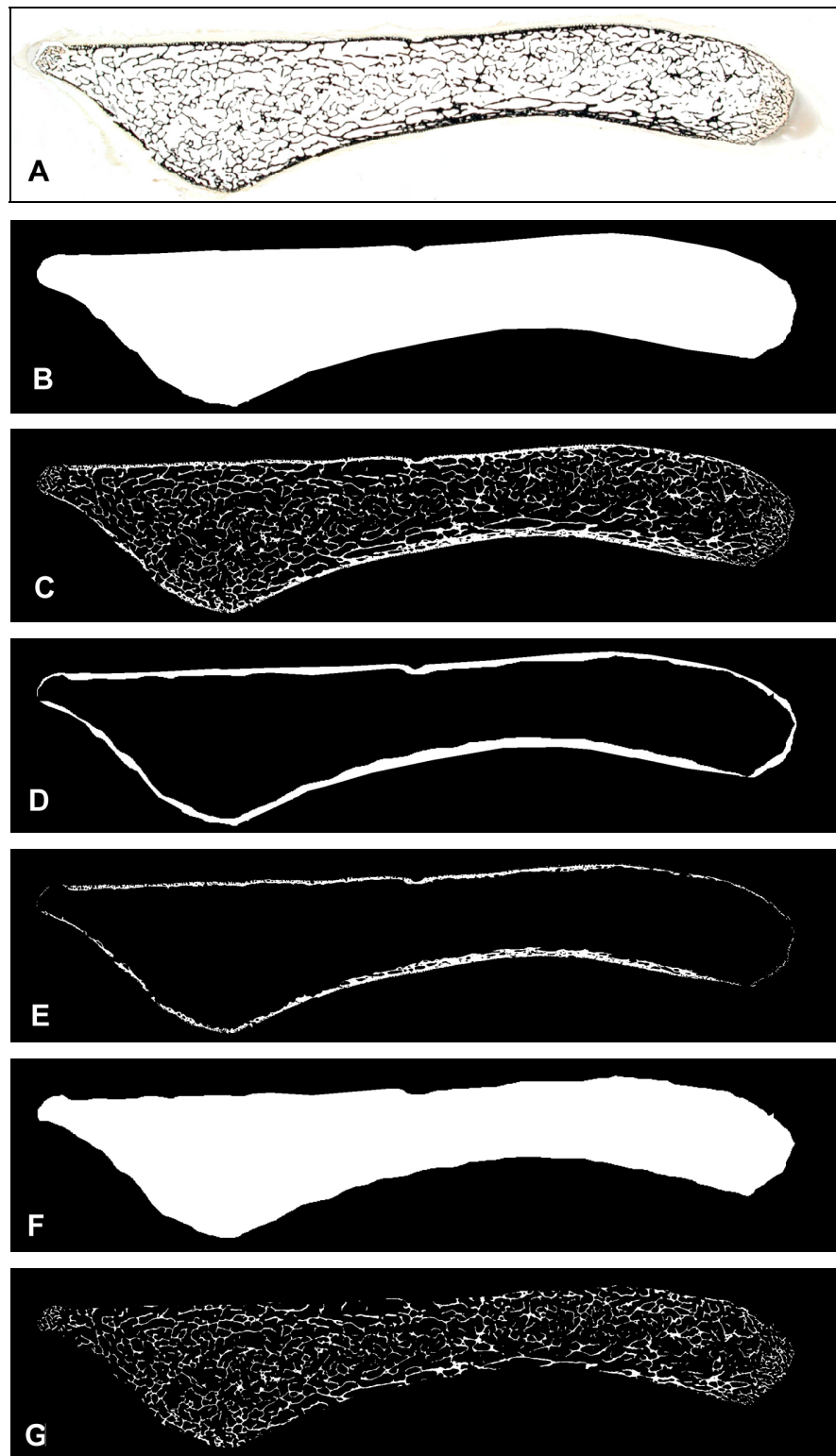
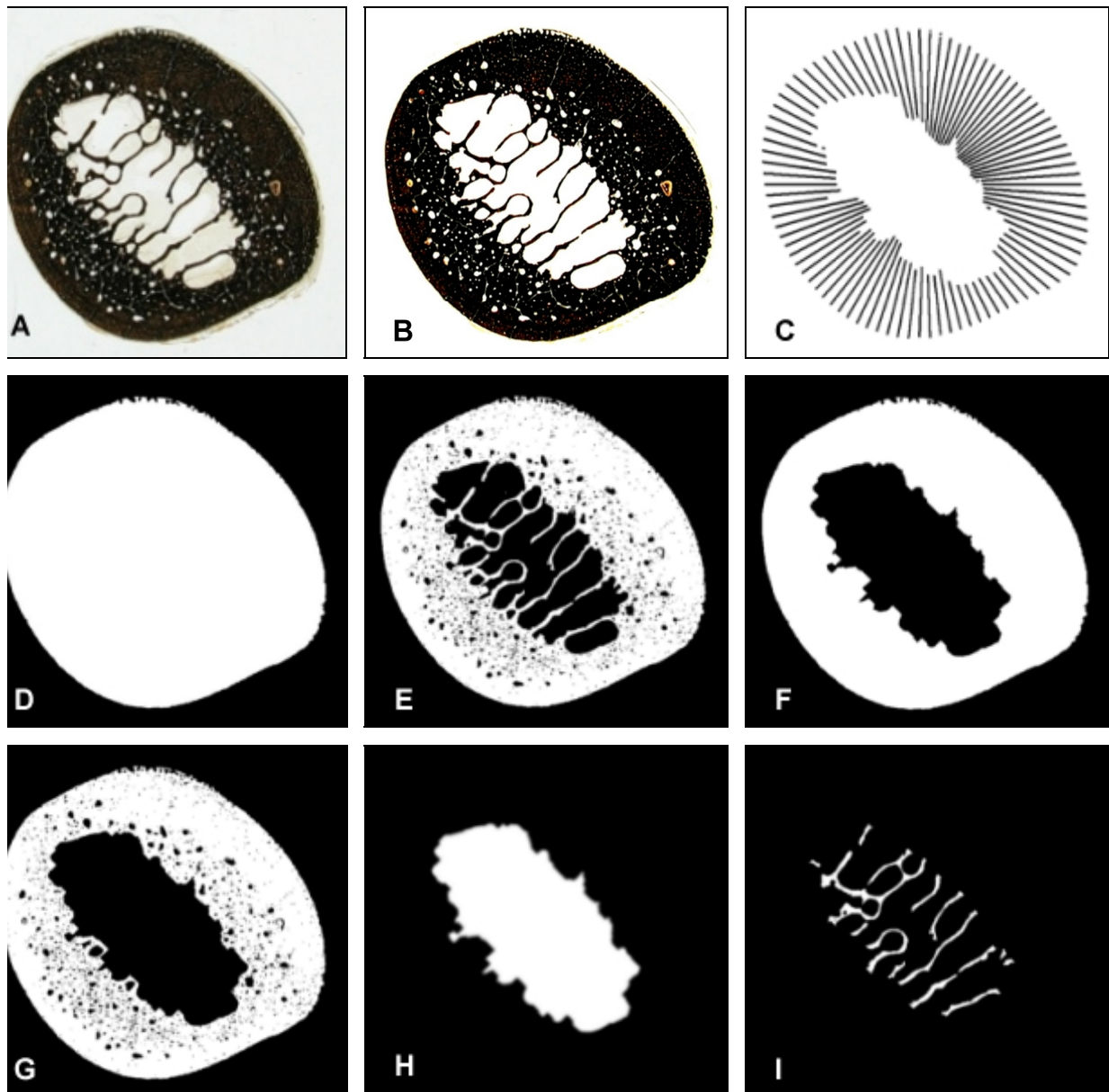


Abbildung 2.3-2: Makro-Ablauf zur Bestimmung der Knochenmikrostrukturparameter an den Beckenkammgesamtpräparaten (A: Originalpräparat kontrastverstärkt, B: Maske für Gesamtfläche, C: binärisierte Gesamtknochenfläche, D: Maske für Kortikalisfläche, E: binärisierte kortikale Knochenfläche, F: Maske für Trabekelfläche, G: binärisierte trabekuläre Knochenfläche)

Für die Auswertung der Gesamtpräparate wurden zunächst die von Kossa Präparate aller 3 Regionen mit der digitalen Kamera auf einem Leuchttisch so photographiert, dass die Vergrößerung bei optimaler Schärfe möglichst hoch war. Zur späteren Kalibrierung wurde immer ein Lineal als Maßstab mit photographiert. Diese Bilder wurden über einen USB-Port mit Hilfe der Photosoftware Nikon-View Version 3 in den Rechner gespeist.



*Abbildung 2.3-3: Makro-Ablauf zur Bestimmung der Knochenmikrostrukturparameter an den Rippengesamtpräparaten (A: Originalpräparat, B: Originalpräparat kontrastverstärkt, C: Strahlenkranzstrecken für Kortikalisdickenmessung, D: Maske für Gesamtfläche, E: binärisierte Gesamtknochenfläche, F: Maske für Kortikalisfläche, G: binärisierte kortikale Knochenfläche, H: Maske für Trabekelfläche, I: binärisierte trabekuläre Knochenfläche)*

Zur Erfassung der gewünschten Parameter wurde das Bild vom Makro geladen und die Kalibrierung anhand des Linealmaßstabs vorgenommen. Dann wurde das Bild durch automatische Kontrastverstärkung mit jeweils im Makro fest definierten Grenzwerten und durch Entfernung von Objekten, die eine im Makro festgelegte Pixelanzahl unterschritten und als Artefakte angesehen wurden, optimiert und mit für alle Präparate einheitlichen Segmentierwerten binärisiert (s. 0 Anhang). Der gesamte Knochen wurde als Messregion definiert.

Um die Strukturparameter für das gesamte Präparat sowie gesondert für kortikalen und trabekulären Knochen bestimmen zu können, wurde das Gesamtpräparat in eine kortikale und eine trabekuläre Fläche unterteilt. Die an den Wirbelkörpern vorhandenen Epiphysenfugen wurden manuell von der Messregion ausgeschlossen.

Anschließend wurden an den Beckenkamm- und Wirbelkörperpräparaten noch Raster vertikaler und horizontaler Geraden über den trabekulären Knochen gelegt sowie vom Schwerpunkt ausgehende Strecken. Die Abschnitte dieser Linien innerhalb der Trabekel wurden gemittelt, um so die Trabekeldicke abschätzen zu können. Bei den Rippenpräparaten wurde aufgrund der geringen Menge trabekulären Knochens davon abgesehen. An diesen wurde allerdings zusätzlich die Kortikalisdicke bestimmt. Dies erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines vom Schwerpunkt ausgehenden Strahlenkranzes.

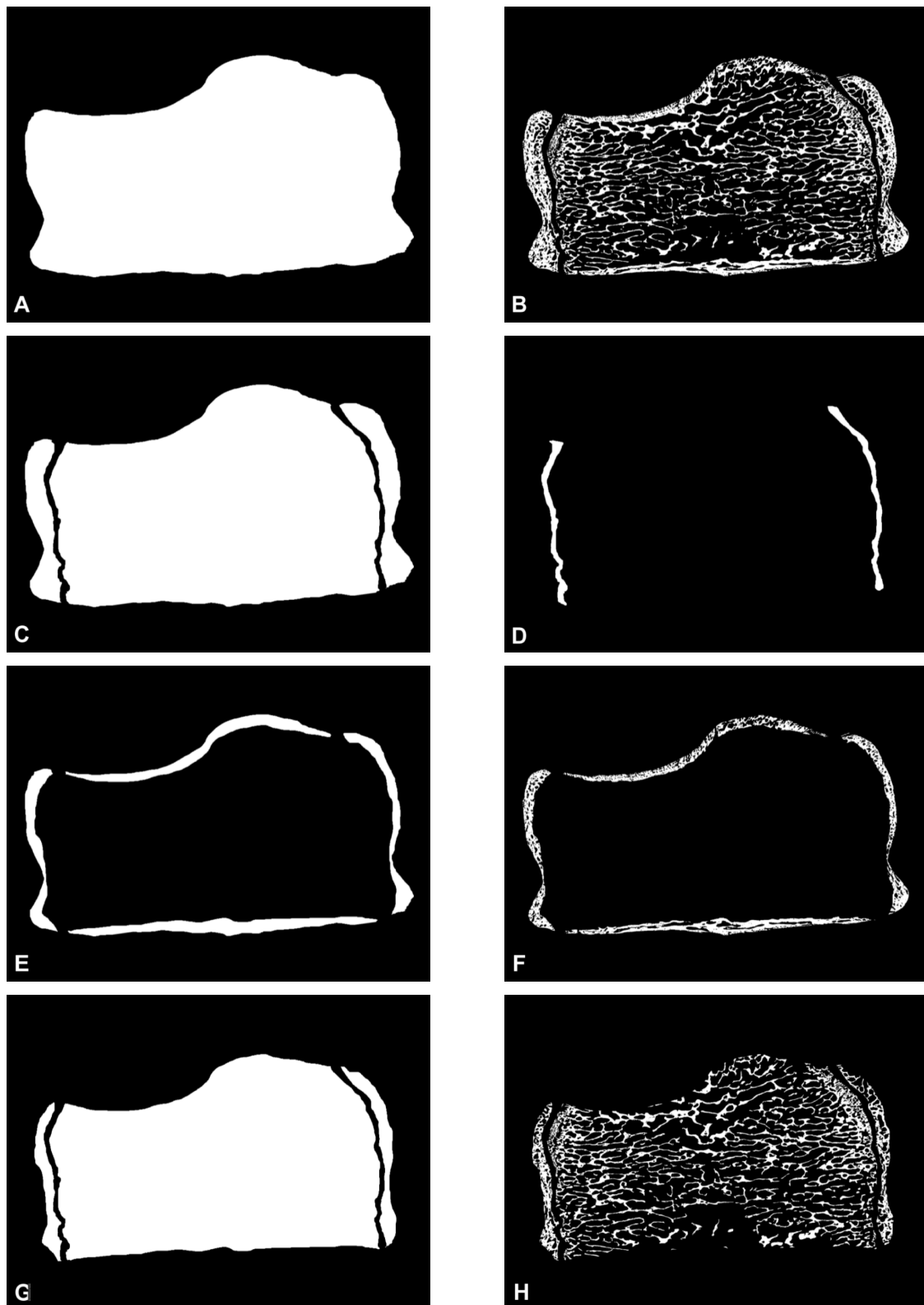
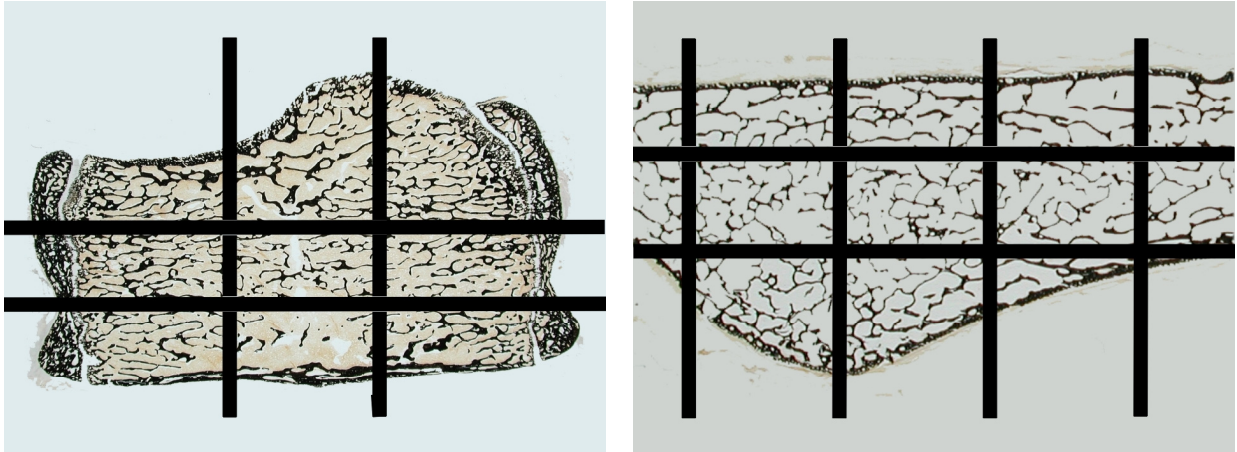
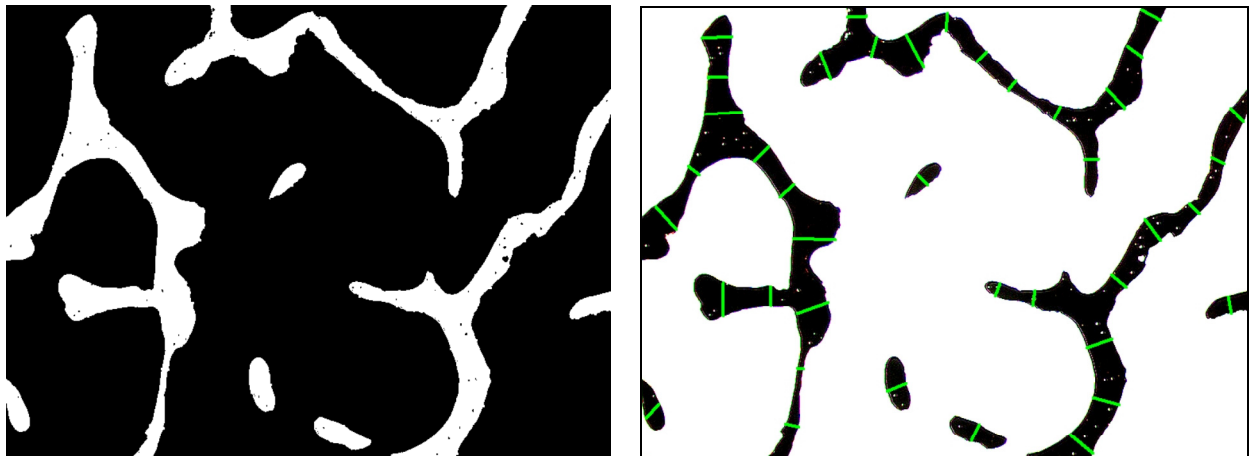


Abbildung 2.3-4: Makro-Ablauf zur Bestimmung der Knochenmikrostrukturparameter an den Wirbelkörpergesamtpräparaten (A: Maske für Gesamtfläche, B: binärisierte Gesamtknochenfläche, C: Maske für Gesamtfläche ohne Epiphysenfugen, D: Epiphysenfugen, E: Maske für Kortikalisfläche, F: binärisierte kortikale Knochenfläche, G: Maske für Trabekelfläche, H: binärisierte trabekuläre Knochenfläche)

Mit einer zweiten Methode, welche auf Gesichtsfeldeinteilung beruhte, wurden an Wirbelkörpern und Beckenkämmen zusätzlich manuell Trabekeldicken und Flächenparameter bestimmt. Jeweils 8 Gesichtsfelder pro Schnitt wurden in 8 definierten Regionen mit einer Vergrößerung von  $5 \times 10 \times 0,55$  aufgenommen. Die eingelesenen Bilder wurden wie oben beschrieben optimiert und binärisiert.



*Abbildung 2.3-5: Raster für die Einteilung in Gesichtsfelder an Wirbelkörpern (links) und Beckenkämmen (rechts)*



*Abbildung 2.3-6: Bestimmung der trabekulären Knochenfläche (links) und der Trabekeldicke (rechts) am Gesichtsfeld*

Pro Gesichtsfeld wurden 40 Strecken zufällig in die Knochentrabekel gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass diese möglichst orthogonal zur Trabekeloberfläche und nicht durch Knoten verliefen.

### 2.3.3.2 *Umfangsparemeter für Knochenresorption und -formation*

An Masson-Goldner gefärbten Schnittpräparaten von Wirbelkörpern und Beckenkämmen wurden folgende Parameter ermittelt:

- Gesamttrabekelumfang (B.Pm) in mm
- Mit Osteoklasten bedeckter Anteil des Gesamttrabekelumfangs (Oc.Pm/B.Pm) in %
- Mit Howship'schen Lakunen ohne Osteoklasten bedeckter Anteil des Gesamttrabekelumfangs (E.Pm/B.Pm) in %
- Oc.Pm/B.Pm und E.Pm/B.Pm zusammengefasst als Resorptionsanteil (Erosion) in %
- Mit Osteoblasten bedecktes Osteoid als Anteil des Gesamttrabekelumfangs (Ob.Pm/B.Pm) in %
- Nicht mit Osteoblasten bedecktes Osteoid als Anteil des Gesamttrabekelumfangs (O.Pm/B.Pm) in %
- Ob.Pm/B.Pm und O.Pm/B.Pm zusammengefasst als Formationsanteil (Formation) in %
- Ruhender Umfang als Anteil des Gesamttrabekelumfangs (B.Pm – [Oc.Pm+E.Pm+Ob.Pm+O.Pm]) in %

Von einer Messung dieser Parameter an den Rippenpräparaten wurde aufgrund der Präparateigenschaften sowie der bisher an dieser Lokalisation kaum in der Literatur erschienen Messungen abgesehen. Die Präparate der Wirbelkörper und Beckenkämme wurden in je 8 Messregionen unterteilt (s. Abb. 2.3-5). Innerhalb dieser wurden dann jeweils 2 zufällige aber nicht überlappende Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 10x10x0,55 in den Rechner eingelesen, so dass jeweils 16 Gesichtsfelder vermessen wurden. Das Digitalisieren der Bilder geschah wie bereits oben beschrieben. Der Trabekelumfang wurde mit dem Cursor nachgefahren, sodann die Anteile des Umfangs markiert, die Osteoid ohne Osteoblasten, Osteoid mit Osteoblasten, leere Howship'sche Lakunen und Lakunen mit Osteoklasten zeigten.



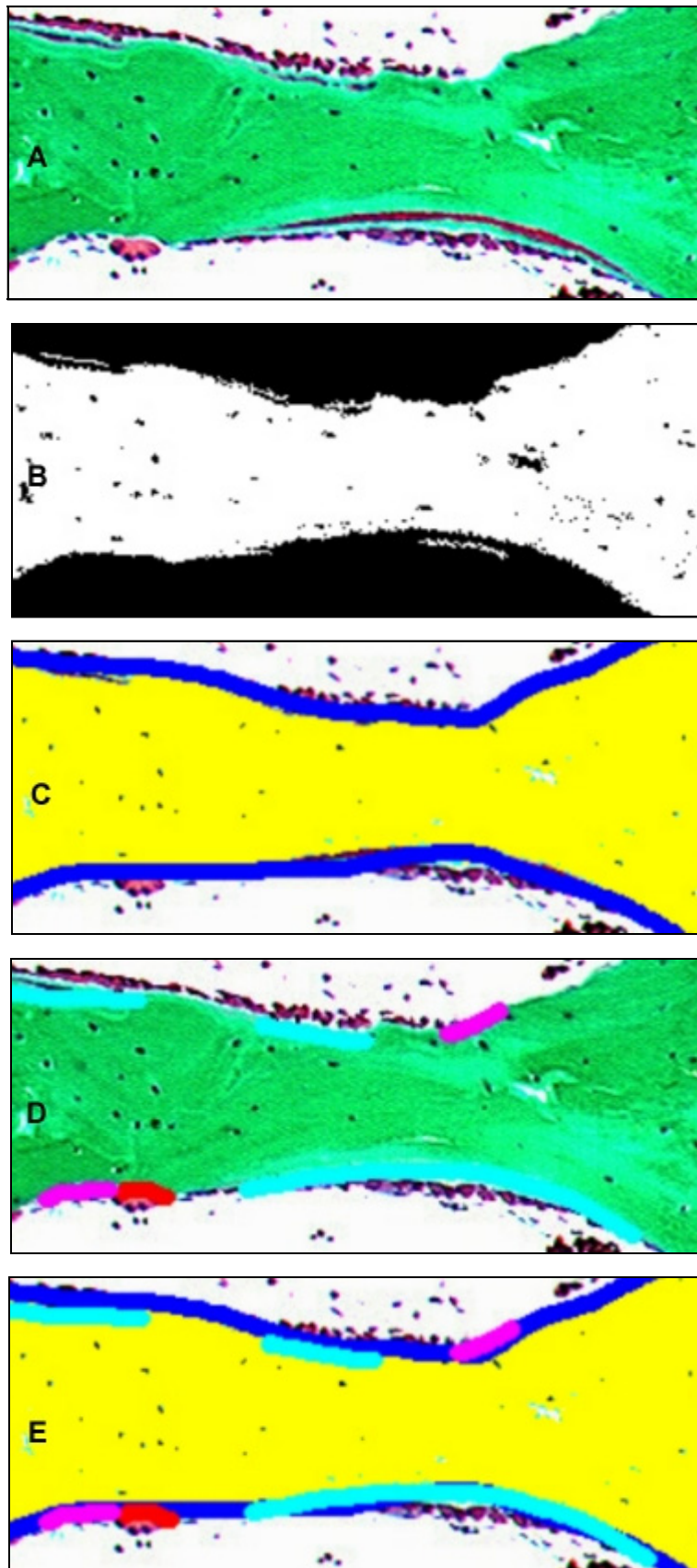


Abbildung 2.3-7: Makro-Ablauf zur Bestimmung der Umfangsparameter (A: Originalpräparat, B: binärisierte Trabekelfläche, C: Trabekelumfang, D: Umfangsanteile – rot: Osteoklasten, rosa: Howship Lakunen, türkis: aktives Osteoid, E: Kombination aus C und D zur prozentualen Berechnung)



Dabei wurden Osteoblasten von Knochenbelegzellen (*lining cells*) unterschieden, so dass von gänzlich flachen Zellen bedecktes Osteoid nicht zur aktiven Anbauzone gezählt wurde, bei den leeren Lakunen wurde eine Tiefe von mindestens einer Lamellenschicht zur Messung vorausgesetzt. Die prozentualen Anteile am Gesamttrabekelumfang wurden berechnet. Durch Subtraktion der vorgenannten Anteile vom Gesamttrabekelumfang ergab sich der ruhende Anteil.

### 2.3.4 Dynamische Histomorphometrie

#### 2.3.4.1 Mineralappositionsrate am kortikalen Knochen

Für die Bestimmung der dynamischen Parameter wurden die Dünnschliffe der Rippen verwendet. Über die Kamera wurden die Bilder von kortikalen dreifachmarkierten kreisähnlichen Osteonen in den Rechner eingelesen. Dazu wurde mit dem Mikroskop ein passender Bildausschnitt in 40x10x0,55facher Vergrößerung eingestellt und mit den drei Filtern am selben Gesichtsfeld die Fluoreszenzbanden dargestellt.

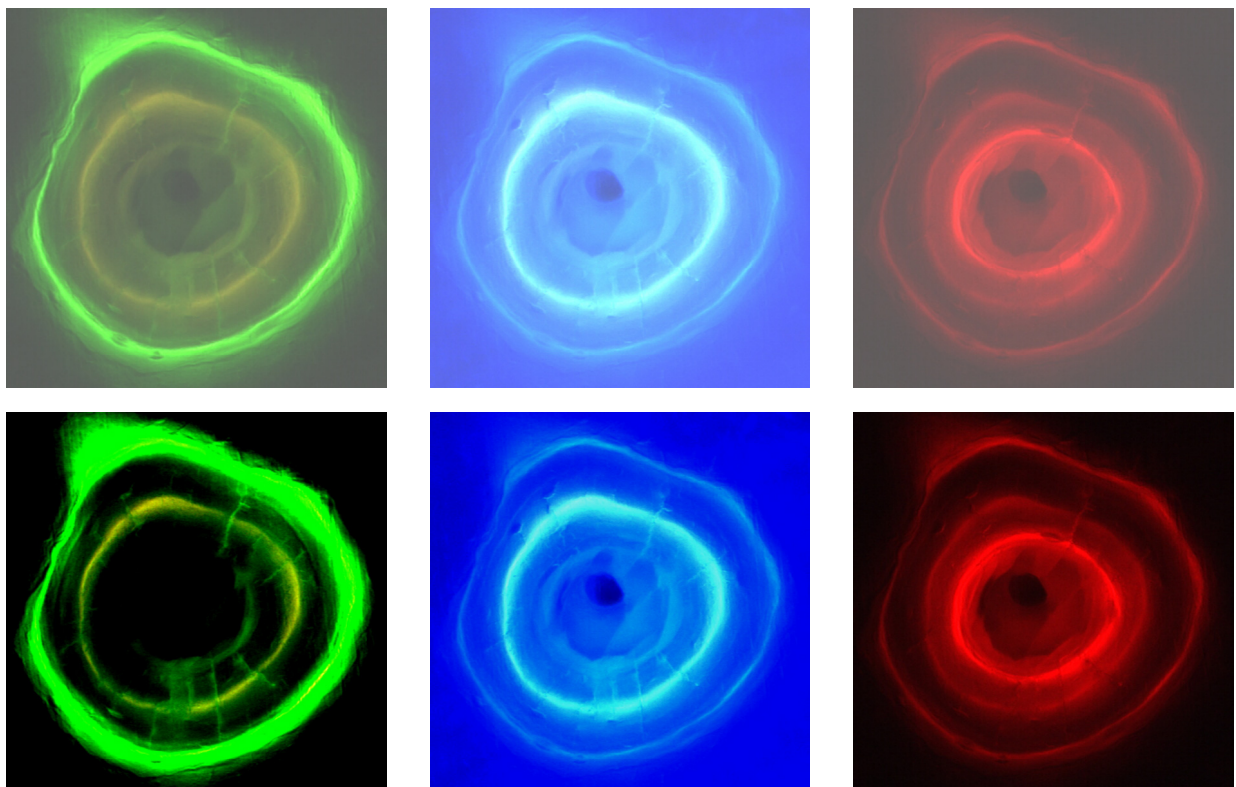
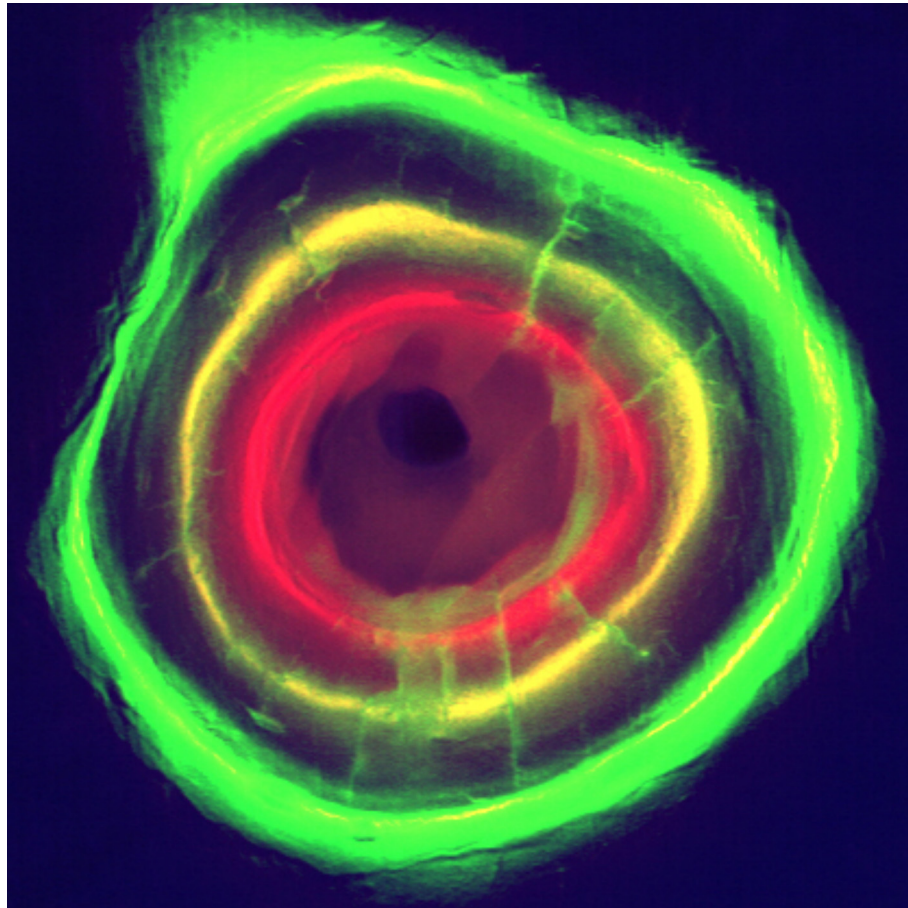


Abbildung 2.3-8: Osteon: Calceinmarkierung (links), Tetrazyklinmarkierung (Mitte), Xylenolmarkierung (rechts); oben: Originalaufnahmen, unten: nach Kontrastverstärkung

Wegen der unterschiedlichen Leuchtintensität wurde die Belichtungszeit der Kamera variiert.

Die digitalisierten Bilder wurden durch Kontrastverstärkung optimiert und zu einem kombinierten Bild zusammengefügt, so dass nun alle 3 Markierungen optimal in einem Bild dargestellt werden konnten. Dieses Kombinationsbild wurde auf Grauwertbasis segmentiert.



*Abbildung 2.3-9: Kombinationsbild aus den 3 Einzelbildern*

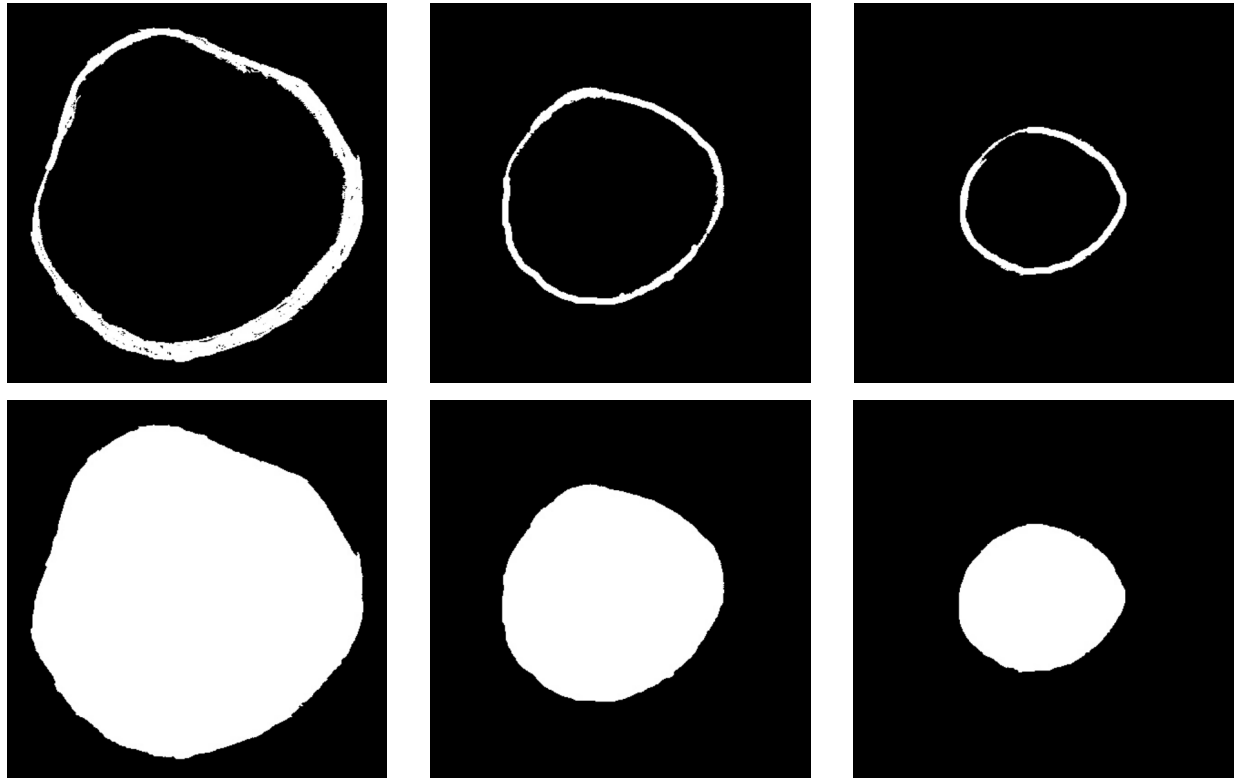
So konnten folgende Parameter bestimmt werden:

- Mineralappositionsrate in  $\mu\text{m}/\text{d}$
- Mineralappositionsrate in  $\mu\text{m}^2/\text{d}$

Diese wurden jeweils für die Zeiträume zwischen den Gaben von Calcein und Tetrazyklin (CT), Tetrazyklin und Xylenolorange (TX) sowie Calcein und Xylenolorange (CX)

bestimmt. Dabei entspricht CT der Distraktionsphase, TX der Konsolidierungsphase und CX dem Gesamtfluorochromierungszeitraum.

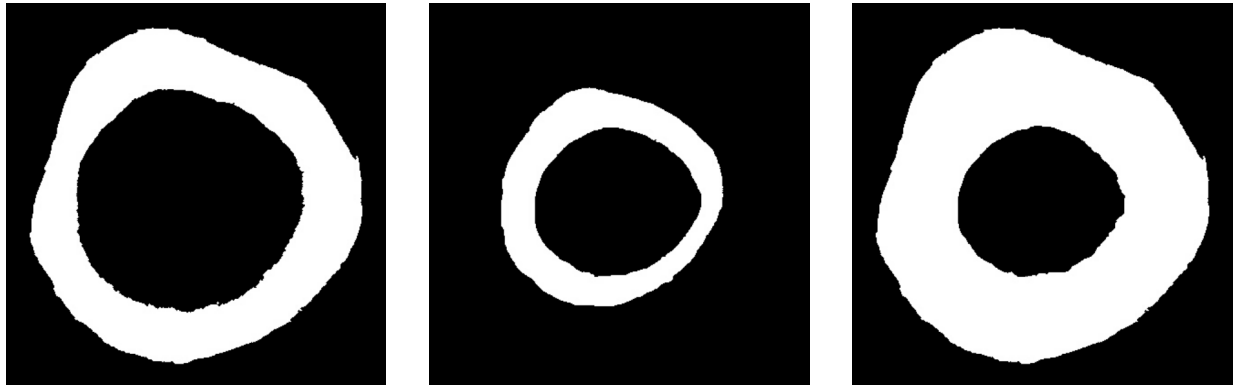
Die einzelnen Ringe wurden über eine Grauwertbestimmung segmentiert und ggf. manuell geschlossen. Aus diesem Grund waren mit diesem Verfahren nur ganz bzw. so gut wie ganz geschlossene kreisähnliche Strukturen zu vermessen. Durch Füllung der Flächen innerhalb der Ringe entstanden pro Osteon 3 kreisähnliche Formen.



*Abbildung 2.3-10: oben: segmentierte geschlossene Ringe der polychromen Sequenzmarkierungen, unten: gefüllte Flächen (links: Calcein, Mitte: Tetrazyklin, rechts: Xylenol)*

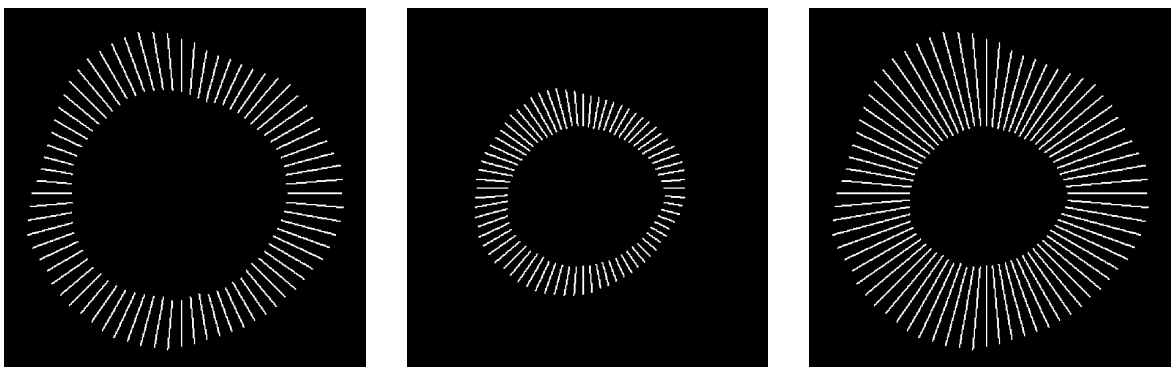
Anhand der größten Fläche wurde der Schwerpunkt des Haverssystems bestimmt. Durch Subtraktion der durch die Tetrazyklinmarkierung begrenzten Fläche von der durch die Calceinmarkierung begrenzten Fläche ergab sich ein Flächenelement, welches der Mineralapposition in  $\mu\text{m}^2$  für den zwischen diesen Markierungen liegenden zeitlichen Abstand von 13 Tagen entsprach. Dividierte man dieses Resultat durch die 13 Tage Intervall zwischen den Applikationen der beiden Marker, so erhielt man Werte für die Mineralapposition in  $\mu\text{m}^2/\text{d}$ . Genauso wurde nun für die Tetrazyklin- und Xylenol-

orangemarkierungen verfahren, wo das Markierungsintervall 7 Tage betrug. Für die Calcein- und Xylenolorangemarkierung ergab sich so ein Intervall von 20 Tagen.



*Abbildung 2.3-11: Flächensegmente zur Bestimmung der Mineralapposition (links: Distraktionsphase, Mitte: Konsolidierungsphase, rechts: gesamter Fluorochromierungszeitraum)*

Zur eindimensionalen Messung der Mineralapposition wurde vom Schwerpunkt aus ein Strahlenkranz mit 72 Strahlen generiert. Teilstrecken dieser Strahlen entstanden innerhalb der durch die Fluorochrommarkierungen begrenzten Flächen. Diese wurden pro Flächensegment gemittelt. Der so erhobene Wert entsprach der Mineralapposition in  $\mu\text{m}$  für das jeweilige zeitliche Markierungsintervall. Dividiert durch die entsprechenden Zeitabstände erhielt man Angaben für die Mineralapposition pro Tag in  $\mu\text{m}$ .



*Abbildung 2.3-12: Strahlenkranzteilstrecken zur Bestimmung der Mineralapposition (links: Distraktionsphase, Mitte: Konsolidierungsphase, rechts: gesamter Fluorochromierungszeitraum)*

Ziel dieser Messungen war es über den dynamischen Knochenparameter Mineralappositionsrates eine Aussage über das Verhalten des Knochenanbaus zu den verschiedenen Zeitabschnitten dieser Untersuchung zu erhalten.

#### **2.3.4.2 *Mineralappositionsrates am spongiösen Knochen***

Von der Quantifizierung der Mineralappositionsrates am spongiösen Knochen der Wirbelkörper- und Beckenkammpräparate wurde abgesehen. Hauptgrund dafür war die durch die Schliffdicke von ca. 80 µm begründete Unschärfe der Markierungen, die durch den annähernd orthogonalen Anschnitt der Rippen dort viel geringer ausgeprägt war, da sich dort die Fluoreszenz der Schichten zu einem intensiven Leuchtband summierte. Hinzu kam die geringere Intensität der Banden in dünneren Präparaten und die teilweise sehr geringe Aktivität pro Präparat.

### **2.3.5 Statistische Analysen**

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software SPSS<sup>45</sup> durchgeführt. Dazu wurden die im Tabellenkalkulationsprogramm Excel<sup>46</sup> archivierten Daten importiert.

Es wurden zunächst deskriptive Analysen durchgeführt. Wegen der geringen Anzahl Tiere wurde nicht von einer Normalverteilung ausgegangen, deshalb kam der Rangsummentest nach Mann-Whitney-U für zwei unverbundene Stichproben zur Anwendung, um Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe zu bestimmen.

---

<sup>45</sup> SPSS 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA

<sup>46</sup> Microsoft Excel 97, Microsoft Corporation, USA

Für verbundene paarige Stichproben wurde der Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon verwendet, um Unterschiede zwischen Distraktions- und Konsolidierungsphase sowie den verschiedenen Messverfahren aufzuzeigen.

Der Friedman-Test wurde für mehrere verbundene Stichproben verwendet, wie sie durch die Rippenmehrfachbiopsie entstanden.

### 3 Ergebnisse

Wenn nicht anders erwähnt, werden die Mediane der Werte sowie Minimum und Maximum angegeben. Den einzelnen Abschnitten sind Tabellen mit weiteren deskriptiven statistischen Parametern beigelegt. Die arabischen Zahlen in den Abbildungen entsprechen Signifikanzniveaus zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe. Die römischen Zahlen entsprechen Signifikanzniveaus zwischen den unterschiedlichen Messverfahren bzw. den verschiedenen Knochenpräparaten oder den verschiedenen Phasen des Versuchs.

#### 3.1 Histologische Beobachtungen

Bei allen untersuchten Tieren waren die Epiphysenfugen der Wirbelkörper sowohl kranial als auch kaudal noch nicht geschlossen (s. Abb. 2.3-4, Abb. 2.3-5). Ebenso zeigten die Beckenkammpräparate knorpelige Apophysen. Das Wachstum der Rippen fand vermehrt auf der ventralen Seite der Kortikalis statt, was durch starke subperiostale Einlagerung von Fluorochromen zu erkennen war (s. Abb. 2.3-1). Die Wirbelkörper zeigten ebenfalls einen hohen subperiostalen Knochenanbau auf der ventralen Seite, nicht jedoch zum Spinalkanal hin. Die Trabekel sind in kraniokaudaler Richtung ausgerichtet gemäß der Hauptbelastungsrichtung mit dazu relativ orthogonalen Querverbindungen. Sowohl Beckenkamm- als auch Wirbelkörperpräparate zeigen rundherum kortikalen Knochen.

#### 3.2 Statische Parameter

##### 3.2.1 Knochenmikrostruktur

Die Gesamtfläche der Wirbelkörperpräparate betrug in der Kontrollgruppe 288,63 mm<sup>2</sup> mit einer Spannweite von 269,19 mm<sup>2</sup> bis 325,74 mm<sup>2</sup> und war damit signifikant kleiner als die Gesamtwirbelkörperfläche der Behandlungsgruppe ( $p = 0,024$ ), welche bei 321,03 mm<sup>2</sup> lag mit einer größeren Spannweite von 266,19 mm<sup>2</sup> bis 347,41 mm<sup>2</sup> (s. Abb. 3.2-1).



**Tabelle 3.2-1: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Wirbelkörper und Beckenkamm, Gesamtschnittmessung, absolute Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis**

Wirbelkörper und Beckenkämme absolut		Wirbelkörper			Beckenkamm		
		Placebo	GH	Total	Placebo	GH	Total
		n=12	n=12	n=24	n=12	n=12	n=24
T.Wi.X/ (mm)	Mittelwert	14,07	14,86	14,47	11,75	12,98	12,37
	St.Dev.	0,97	1,38	1,23	2,03	2,15	2,14
	Median	14,05	14,79	14,65	11,15	12,61	11,82
	1./3. Quartile	13,17/14,80	13,77/15,69	13,60/14,94	10,14/12,78	11,49/13,99	10,65/13,14
	Min/Max	12,72/15,61	12,94/18,16	12,72/18,16	9,59/15,70	10,45/17,09	9,59/17,09
T.Wi.Y/ (mm)	Mittelwert	28,36	29,03	28,69	48,05	53,13	50,59
	St.Dev.	2,15	1,26	1,76	8,66	8,27	8,68
	Median	28,22	29,06	28,62	48,05	53,37	50,87
	1./3. Quartile	27,04/29,64	27,88/29,90	27,67/29,90	45,21/55,75	45,21/60,99	45,21/57,57
	Min/Max	25,08/32,21	27,27/31,63	25,08/32,21	25,58/57,66	40,64/63,56	25,58/63,56
T.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	294,44	316,02	305,23	117,53	127,20	122,37
	St.Dev.	20,37	24,32	24,55	25,47	22,21	23,89
	Median	288,63	321,03	307,51	106,88	118,41	115,08
	1./3. Quartile	278,15/314,34	299,21/333,81	281,90/324,96	102,13/125,76	113,67/136,52	105,00/131,96
	Min/Max	269,19/325,74	266,19/347,41	266,19/347,41	95,55/175,63	100,47/173,95	95,55/175,63
B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	100,67	94,64	97,65	28,60	29,06	28,83
	St.Dev.	13,24	10,14	11,94	11,35	8,14	9,66
	Median	101,77	95,20	98,17	25,67	26,06	25,87
	1./3. Quartile	92,90/109,16	85,69/103,94	87,43/105,82	22,30/28,77	23,01/34,36	22,81/31,67
	Min/Max	76,48/121,79	81,19/112,78	76,48/121,79	18,54/60,05	20,74/47,09	18,54/60,05
Cl.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	42,56	41,25	41,90	18,43	26,89	22,66
	St.Dev.	6,72	5,92	6,23	6,04	7,86	8,10
	Median	42,33	40,71	41,84	16,83	24,38	20,80
	1./3. Quartile	38,07/44,27	35,93/47,66	37,21/44,85	15,76/18,99	22,13/33,32	16,68/26,75
	Min/Max	32,12/56,77	32,61/50,05	32,12/56,77	11,35/33,01	16,14/42,17	11,35/42,17
Cl.B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	32,54	28,54	30,54	11,06	12,85	11,95
	St.Dev.	6,72	4,62	6,00	5,80	5,03	5,39
	Median	31,77	27,47	30,30	9,48	10,52	10,14
	1./3. Quartile	28,01/33,75	24,86/33,34	25,46/33,75	7,27/11,85	9,79/15,63	8,52/13,90
	Min/Max	23,04/45,88	23,11/36,50	23,04/45,88	5,68/25,99	7,54/24,33	5,68/25,99
Tb.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	251,88	274,77	263,32	99,10	100,31	99,71
	St.Dev.	18,63	25,61	24,83	20,43	16,80	18,30
	Median	250,66	276,70	265,70	92,65	96,82	95,95
	1./3. Quartile	236,44/265,09	265,81/297,27	236,95/283,67	83,74/108,97	89,51/104,77	86,66/104,77
	Min/Max	227,32/284,50	221,20/305,27	221,20/305,27	80,05/142,62	78,56/135,16	78,56/142,62
Tb.B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	68,11	66,09	67,10	17,54	16,20	16,87
	St.Dev.	7,53	9,43	8,41	5,69	3,77	4,77
	Median	68,91	69,24	69,24	15,45	16,36	16,09
	1./3. Quartile	64,57/75,07	58,16/72,03	63,61/72,91	14,90/17,75	13,03/19,17	14,46/17,89
	Min/Max	53,43/76,28	48,79/77,82	48,79/77,82	12,84/34,05	10,42/22,74	10,42/34,05
Tb.Wi/ (µm)	Mittelwert	221,43	202,16	211,79	137,01	127,10	132,06
	St.Dev.	19,38	13,32	19,01	22,00	7,67	16,89
	Median	223,34	202,44	205,54	134,23	126,63	128,86
	1./3. Quartile	204,54/241,53	189,25/205,87	197,08/226,59	125,37/135,87	119,51/134,20	124,13/135,63
	Min/Max	190,60/250,07	187,73/226,67	187,73/250,07	119,17/204,00	116,49/138,07	116,49/204,00

Die Präparathöhe (T.Wi.Y) der Wirbelkörper in kraniokaudaler Richtung maß 28,22 mm (25,08 mm – 32,21 mm) in der Placebogruppe und 29,06 mm (27,21 mm – 31,63) in der Wachstumshormongruppe, was keine signifikante Differenz bedeutete. Für die Präparattiefe (T.Wi.X) der Wirbelkörper in ventrodorsaler Richtung wurde bei den Kontrolltieren ein Wert von 14,05 mm (12,72 mm - 15,61 mm) ermittelt, bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren ein Wert von 14,79 mm (12,94 mm – 18,16 mm). Damit bestand zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied.

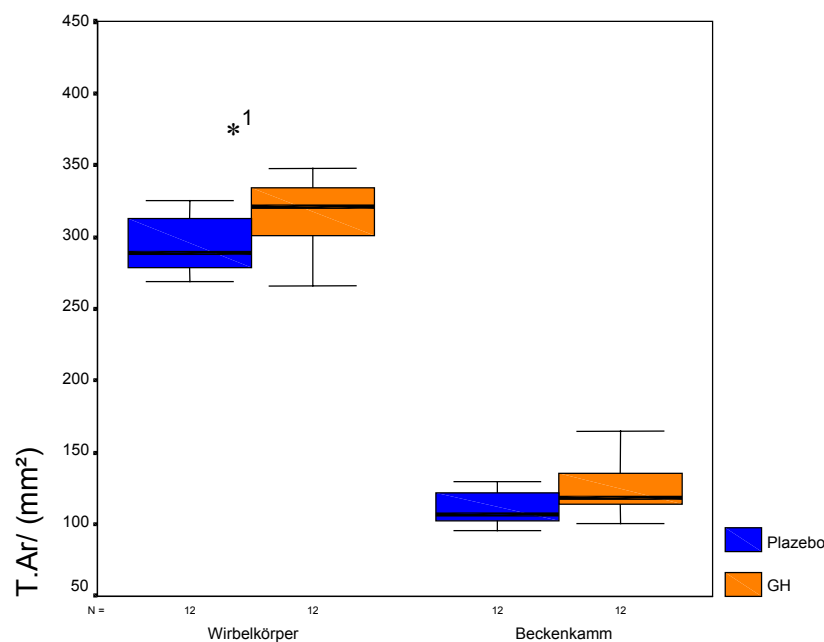


Abbildung 3.2-1: Gesamtknochenfläche (T.Ar) in mm²,  $p^{*1} = 0,024$

Keine statistisch signifikanten Differenzen wurden bei der Gesamtfläche der Beckenkammbiopsien zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe ermittelt, welche 106,88 mm² (Placebo) bzw. 118,41 mm² (GH) betrugen, mit einer ähnlichen Spannweite von 95,55 mm² bis 175,63 mm² in der Kontroll- und 106,47 mm² bis 173,95 mm² in der Behandlungsgruppe (s. Abb. 3.2-1).

Die weitere Betrachtung der Präparatausmaße ergab hier eine Länge von 48,05 mm (25,58 mm – 57,66 mm) bei den Placebotieren und 53,37 mm (40,64 mm – 63,56 mm) bei den GH-Tieren. Dies stellte keinen signifikanten Unterschied dar. Die Breite betrug 11,15 mm (9,59 mm – 15,70 mm) in der Kontrollgruppe und 12,61 mm (10,45 mm – 17,09 mm) in der Behandlungsgruppe, was ebenfalls keine signifikante Differenz war.

**Tabelle 3.2-2:** Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Rippen, einzeln, Gesamtschnittmessung, absolute Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Rippen einzeln absolut		R 1		R 2		R 3	
		Placebo	GH	Placebo	GH	Placebo	GH
		n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
T.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	21,90	24,71	18,36	19,27	14,65	15,99
	St.Dev.	4,36	3,01	4,37	3,29	4,06	3,14
	Median	20,67	24,96	16,87	18,97	14,40	16,18
	1./3. Quartile	18,50/25,27	21,69/26,68	14,59/22,69	16,60/21,33	11,04/18,60	12,77/17,51
	Min/Max	16,00/29,47	20,39/30,04	12,81/26,18	14,31/24,80	8,55/20,83	12,42/22,28
B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	15,52	16,61	12,25	12,46	9,38	9,79
	St.Dev.	3,27	2,15	2,42	1,93	2,67	1,81
	Median	15,26	16,25	11,85	12,76	9,47	9,72
	1./3. Quartile	12,62/18,49	14,92/18,13	10,42/14,20	10,94/13,92	6,98/11,57	8,07/11,60
	Min/Max	10,93/20,80	13,67/20,80	8,26/16,44	8,43/15,41	5,14/14,11	7,22/12,43
Ct.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	15,46	16,72	12,33	12,96	9,45	9,97
	St.Dev.	3,73	2,25	2,66	2,20	2,92	2,04
	Median	15,14	16,51	12,07	13,44	8,71	9,65
	1./3. Quartile	11,71/19,42	15,22/18,25	10,21/14,59	11,08/14,75	6,85/12,01	7,80/12,13
	Min/Max	9,95/20,49	13,49/21,51	7,70/16,76	8,61/16,20	5,46/13,96	7,56/12,81
Ct.B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	14,67	15,55	11,31	11,51	8,47	8,70
	St.Dev.	3,39	2,09	2,30	1,89	2,57	1,72
	Median	14,54	15,24	11,18	11,79	7,85	8,50
	1./3. Quartile	11,28/17,95	14,09/16,92	9,71/13,13	10,07/12,82	6,26/11,05	6,99/10,59
	Min/Max	9,60/19,87	12,61/20,24	7,08/15,52	7,35/14,05	4,62/12,96	6,36/11,02
Tb.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	6,44	7,99	6,02	6,32	5,20	6,02
	St.Dev.	1,11	1,50	2,35	2,41	2,02	2,05
	Median	5,96	8,00	5,14	5,54	4,50	5,32
	1./3. Quartile	5,65/6,89	6,89/8,86	4,70/7,55	4,23/8,64	3,88/6,41	4,77/7,65
	Min/Max	5,44/9,10	5,69/11,22	2,96/11,96	3,29/9,89	3,09/10,38	3,24/9,77
Tb.B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	0,85	1,05	0,94	0,94	0,90	1,08
	St.Dev.	0,38	0,37	0,54	0,35	0,50	0,38
	Median	0,83	1,04	0,81	0,92	0,76	1,05
	1./3. Quartile	0,63/1,08	0,77/1,32	0,67/0,95	0,67/1,28	0,56/1,09	0,75/1,37
	Min/Max	0,19/1,53	0,55/1,84	0,47/2,54	0,42/1,45	0,45/2,28	0,55/1,85
Ct.Wi/ (mm)	Mittelwert	1,16	1,16	1,02	0,97	0,87	0,77
	St.Dev.	0,18	0,09	0,15	0,20	0,19	0,15
	Median	1,24	1,21	1,01	0,98	0,83	0,80
	1./3. Quartile	0,97/1,33	1,07/1,23	0,95/1,09	0,85/1,12	0,71/1,08	0,62/0,84
	Min/Max	0,88/1,36	0,99/1,27	0,72/1,30	0,55/1,25	0,63/1,17	0,56/1,01

**Tabelle 3.2-3:** Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Rippen, zusammengefasst, Gesamtschnittmessung, absolute Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Rippen zusammengefasst absolut		R1	R2	R3	Rges		
		Total	Total	Total	Placebo	GH	Total
		n=24	n=24	n=24	n=12	n=12	n=24
T.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	23,31	18,81	15,32	18,30	19,99	19,15
	St.Dev.	3,93	3,81	3,62	4,15	2,35	4,98
	Median	23,06	18,37	15,86	17,58	19,60	19,12
	1./3. Quartile	20,40/26,47	15,71/21,88	12,54/17,51	14,81/22,34	17,91/21,57	15,71/22,41
	Min/Max	16,00/30,04	12,81/26,18	8,55/22,28	12,45/24,58	17,30/25,05	8,55/30,04
B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	16,06	12,35	9,59	12,38	12,95	12,67
	St.Dev.	2,76	2,14	2,24	2,64	1,25	3,57
	Median	16,07	12,49	9,72	12,45	12,97	12,32
	1./3. Quartile	13,90/18,23	10,68/14,10	7,85/11,57	10,22/14,59	11,95/13,46	10,18/14,96
	Min/Max	10,93/20,80	8,26/16,44	5,14/14,11	8,11/17,12	11,35/16,15	5,14/20,80
Ct.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	16,09	12,64	9,71	12,41	13,22	12,81
	St.Dev.	3,08	2,41	2,48	2,91	1,47	3,72
	Median	15,69	13,08	9,03	12,38	12,95	12,81
	1./3. Quartile	14,18/18,71	11,02/14,68	7,76/12,13	9,93/14,55	12,21/13,97	9,99/15,10
	Min/Max	9,95/21,51	7,70/16,76	5,46/13,96	7,70/16,97	11,18/16,66	5,46/21,51
Ct.B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	15,11	11,41	8,59	11,48	11,92	11,70
	St.Dev.	2,79	2,06	2,14	2,58	1,24	3,55
	Median	15,13	11,67	8,09	11,70	11,81	11,38
	1./3. Quartile	13,35/17,33	10,05/12,86	6,99/10,76	9,46/13,15	10,86/12,57	9,11/14,03
	Min/Max	9,60/20,24	7,08/15,52	4,62/12,96	7,10/16,12	10,48/15,04	4,62/20,24
Tb.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	7,22	6,17	5,61	5,89	6,78	6,33
	St.Dev.	1,52	2,33	2,03	1,63	1,64	2,07
	Median	6,90	5,20	4,93	5,13	6,46	5,79
	1./3. Quartile	5,85/8,46	4,48/8,06	4,29/6,58	4,83/6,74	5,39/8,43	4,77/7,96
	Min/Max	5,44/11,22	2,96/11,96	3,09/10,38	4,57/10,11	4,82/9,38	2,96/11,96
Tb.B.Ar/ (mm <sup>2</sup> )	Mittelwert	0,95	0,94	0,99	0,90	1,03	0,96
	St.Dev.	0,38	0,44	0,45	0,38	0,25	0,42
	Median	0,94	0,81	0,87	0,79	0,92	0,87
	1./3. Quartile	0,67/1,23	0,67/1,18	0,68/1,24	0,67/1,00	0,86/1,20	0,68/1,18
	Min/Max	0,19/1,84	0,42/2,54	0,45/2,28	0,52/1,97	0,68/1,53	0,19/2,54
Ct.Wi/ (mm)	Mittelwert	1,16	0,99	0,82	1,02	0,96	0,99
	St.Dev.	0,14	0,18	0,17	0,15	0,09	0,21
	Median	1,21	1,01	0,81	1,00	0,94	1,01
	1./3. Quartile	1,05/1,26	0,91/1,10	0,67/0,97	0,90/1,16	0,90/1,05	0,84/1,19
	Min/Max	0,88/1,36	0,55/1,30	0,56/1,17	0,76/1,24	0,85/1,11	0,55/1,36

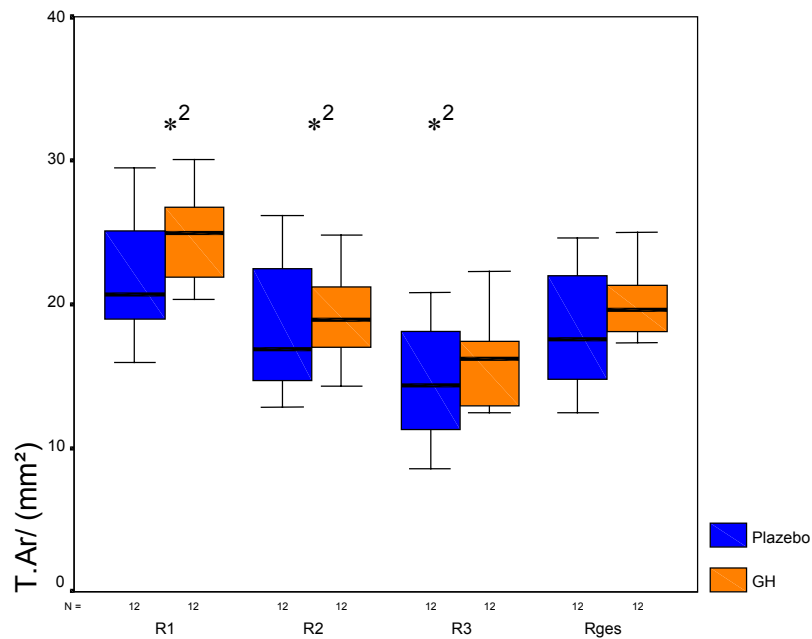


Abbildung 3.2-2: Gesamtknochenfläche (T.Ar) in mm²,  $p^{*2} < 0,001$

Die Gesamtfläche der Rippenpräparate betrug 17,58 mm² (12,45 mm² – 24,58 mm²) in der Placebogruppe und 19,60 mm² (17,30 mm² - 25,05 mm²) in der Wachstumshormongruppe, woraus sich kein statistisch signifikanter Unterschied ergab. Vergleich man die drei Entnahmestellen untereinander, so zeigte sich unabhängig von der Gruppenzuordnung ein signifikanter Unterschied der Gesamtknochenfläche ( $p < 0,001$ ). Die größte Fläche besaßen die dorsalen Biopsien, vor den mittleren und vor den ventralen sowohl in der GH- als auch in der Placebogruppe (s. Abb. 3.2-2).

**Tabelle 3.2-4:** Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Wirbelkörper und Beckenkamm, Gesamtschnittmessung, prozentuale Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Wirbelkörper und Beckenkämme prozentual		Wirbelkörper			Beckenkamm		
		Placebo	GH	Total	Placebo	GH	Total
		n=12	n=12	n=24	n=12	n=12	n=24
B.Ar/T.Ar/ (%)	Mittelwert	34,19	29,95	32,07	23,85	22,61	23,23
	St.Dev.	3,92	2,28	3,81	4,40	3,19	3,81
	Median	35,41	29,62	30,79	23,77	22,33	23,21
	1./3. Quartile	30,62/37,95	28,82/31,42	29,00/35,75	20,20/25,86	19,97/25,82	19,97/25,86
	Min/Max	28,41/39,17	25,60/34,95	25,60/39,17	17,72/34,19	18,00/27,39	17,72/34,19
Ct.B.Ar/Ct.Ar/ (%)	Mittelwert	75,98	69,16	72,57	57,51	47,19	52,35
	St.Dev.	3,78	3,77	5,08	10,20	7,54	10,23
	Median	75,03	70,10	72,43	56,65	45,73	51,53
	1./3. Quartile	73,38/77,26	66,41/71,81	70,02/75,12	50,92/64,03	41,54/52,67	44,19/59,27
	Min/Max	71,74/85,03	62,07/74,56	62,07/85,03	40,74/78,74	37,55/62,74	37,55/78,74
Tb.B.Ar/Tb.Ar/ (%)	Mittelwert	27,11	24,00	25,56	17,54	16,12	16,83
	St.Dev.	3,11	2,15	3,06	2,56	2,58	2,61
	Median	28,63	24,07	25,01	17,10	16,54	16,61
	1./3. Quartile	24,07/29,18	23,29/25,24	23,45/28,66	15,79/18,52	14,75/16,99	15,57/18,25
	Min/Max	22,47/32,06	20,17/28,42	20,17/32,06	13,91/23,88	11,71/20,49	11,71/23,88
Ct.Ar/T.Ar/ (%)	Mittelwert	14,46	13,15	13,80	15,55	20,98	18,26
	St.Dev.	2,04	2,36	2,26	2,71	3,96	4,32
	Median	14,48	12,33	12,77	15,90	21,12	18,69
	1./3. Quartile	12,62/15,81	11,14/14,99	15,75	13,39/18,17	19,42/22,17	15,45/21,26
	Min/Max	11,93/17,96	10,58/17,60	10,58/17,96	10,54/18,87	13,71/30,61	10,54/30,61
Tb.Ar/T.Ar/ (%)	Mittelwert	85,54	86,85	86,20	84,45	79,02	81,74
	St.Dev.	2,04	2,36	2,26	2,71	3,96	4,32
	Median	85,52	87,67	87,23	84,10	78,88	81,31
	1./3. Quartile	84,19/87,38	85,01/88,86	84,25/87,85	81,83/86,61	77,83/80,58	78,74/84,55
	Min/Max	82,04/88,07	82,40/89,42	82,04/89,42	81,13/89,46	69,39/86,29	69,39/89,46

Der prozentuale Anteil der mineralisierten Knochenfläche an der Gesamtfläche war bei den Wirbelkörpern in der Wachstumshormongruppe signifikant geringer als in der Placebogruppe ( $p = 0,012$ ), er maß 29,62 % (GH) sowie 35,41 % (Placebo) bei ähnlichen Spannweiten von 25,60 % bis 34,95 % in der GH-Gruppe und 28,41 % bis 39,17 % in der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.2-3).

Dieser Unterschied war an den Iliakalbiopsien nicht nachzuweisen. Dort wurden Werte von 23,77 % (17,72 % - 34,19 %) für die Placebotiere und 22,33 % (18,00 % - 27,39 %) für die Wachstumshormontiere ermittelt (s. Abb. 3.2-3).

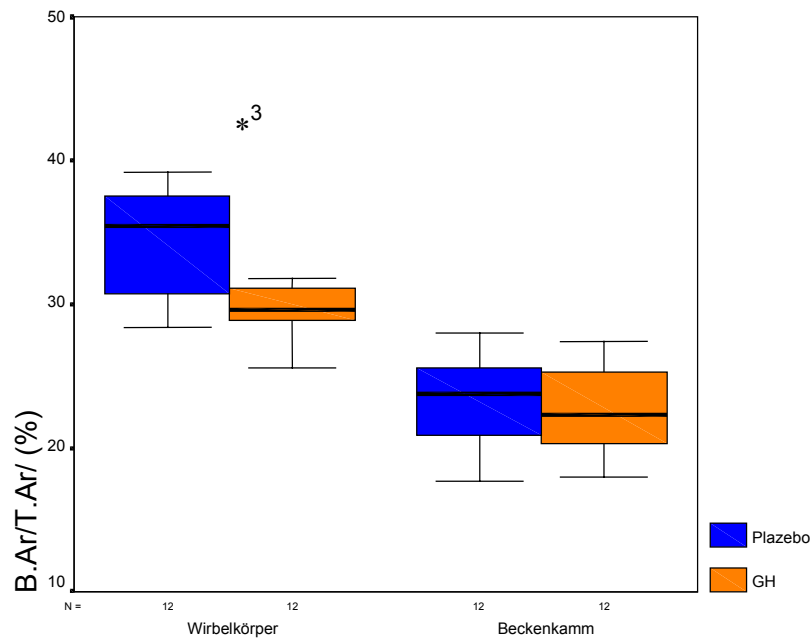


Abbildung 3.2-3: Anteil mineralisierter Knochenfläche an der Gesamtknochenfläche (B.Ar/T.Ar),  $p^{*3} = 0,012$

Tabelle 3.2-5: Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Rippen, einzeln, Gesamtschnittmessung, prozentuale Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Rippen einzeln prozentual		R 1		R 2		R 3	
		Placebo	GH	Placebo	GH	Placebo	GH
		n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
B.Ar/T.Ar (%)	Mittelwert	70,73	67,26	67,41	65,15	64,10	61,54
	St.Dev.	2,77	3,97	5,06	7,76	5,75	5,46
	Median	70,37	67,55	69,26	66,79	63,35	60,85
	1./3. Quartile	68,37/71,58	64,44/69,85	62,78/70,91	57,81/72,43	60,56/68,77	57,89/66,35
	Min/Max	67,95/76,90	60,57/73,16	57,32/74,35	52,02/76,43	52,67/74,58	50,49/68,48
Ct.Ar/T.Ar (%)	Mittelwert	70,05	67,70	67,68	67,76	64,45	62,75
	St.Dev.	4,96	4,30	6,63	9,36	7,70	8,30
	Median	71,44	67,83	67,60	68,31	64,66	60,93
	1./3. Quartile	65,77/73,61	65,30/71,36	64,27/72,35	59,78/77,22	61,45/69,50	59,31/70,13
	Min/Max	62,18/76,98	57,47/73,12	54,33/79,52	53,14/77,68	45,60/77,80	44,33/73,93
Tb.Ar/T.Ar (%)	Mittelwert	29,95	32,30	32,32	32,24	35,55	37,25
	St.Dev.	4,96	4,30	6,63	9,36	7,70	8,30
	Median	28,56	32,17	32,40	31,69	35,34	39,07
	1./3. Quartile	26,39/34,23	28,64/34,70	27,65/35,73	22,78/40,22	30,50/38,55	29,87/40,69
	Min/Max	23,02/37,82	26,88/42,53	20,48/45,67	22,32/46,86	22,20/54,40	26,07/55,67
Ct.B.Ar/Ct.Ar (%)	Mittelwert	95,16	93,05	91,95	88,97	89,90	87,43
	St.Dev.	2,31	2,29	2,80	3,71	4,57	3,03
	Median	95,64	93,42	91,94	89,23	90,77	86,84
	1./3. Quartile	94,31/96,95	91,17/94,00	89,75/94,43	85,82/91,49	85,71/93,79	85,21/90,08
	Min/Max	90,21/97,80	88,90/97,39	87,63/96,62	82,65/94,85	81,26/95,42	82,13/92,67
Tb.B.Ar/Tb.Ar (%)	Mittelwert	13,08	13,30	15,53	15,20	16,78	18,00
	St.Dev.	5,59	4,28	3,92	3,34	3,11	2,22
	Median	12,00	13,18	14,34	15,03	16,73	17,18
	1./3. Quartile	10,44/16,66	9,43/15,93	12,85/19,03	12,43/18,20	14,34/18,95	16,42/19,72
	Min/Max	3,32/22,64	6,46/20,58	10,62/23,13	9,57/20,31	11,84/21,98	14,99/22,66

**Tabelle 3.2-6:** Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Rippen, einzeln, Gesamtschnittmessung, prozentuale Werte, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Rippen zusammengefasst prozentual		R1	R2	R3	Rges		
		Total	Total	Total	Placebo	GH	Total
		n=24	n=24	n=24	n=12	n=12	n=24
B.Ar/T.Ar/ (%)	Mittelwert	68,99	66,28	62,82	67,41	64,65	66,03
	St.Dev.	3,79	6,51	5,64	3,50	4,92	5,93
	Median	69,28	67,28	62,58	67,78	64,46	67,32
	1./3. Quartile	67,27/70,63	61,59/70,91	59,71/67,48	64,85/70,07	60,14/68,94	61,64/70,17
	Min/Max	60,57/76,90	52,02/76,43	50,49/74,58	59,95/72,13	57,43/72,41	50,49/76,90
Ct.Ar/T.Ar/ (%)	Mittelwert	68,88	67,72	63,60	67,40	66,07	66,73
	St.Dev.	4,70	7,93	7,88	4,60	6,10	7,27
	Median	69,59	67,60	62,13	68,68	65,31	66,78
	1./3. Quartile	65,53/71,86	61,12/74,68	60,41/70,13	64,43/70,40	62,03/72,43	61,65/71,83
	Min/Max	57,47/76,98	53,14/79,52	44,33/77,80	57,30/74,55	55,30/74,19	44,33/79,52
Tb.Ar/T.Ar/ (%)	Mittelwert	31,12	32,28	36,40	32,60	33,93	33,27
	St.Dev.	4,70	7,93	7,88	4,60	6,10	7,27
	Median	30,41	32,40	37,87	31,32	34,69	33,22
	1./3. Quartile	28,14/34,47	25,32/38,88	29,87/39,59	29,60/35,57	27,57/37,97	28,17/38,35
	Min/Max	23,02/42,53	20,48/46,86	22,20/55,67	25,45/42,70	25,81/44,70	20,48/55,67
Ct.B.Ar/Ct.Ar/ (%)	Mittelwert	94,10	90,46	88,66	92,34	89,82	91,08
	St.Dev.	2,50	3,56	4,00	2,74	2,40	4,06
	Median	94,19	90,48	88,99	92,53	90,53	91,70
	1./3. Quartile	92,09/96,29	87,81/92,54	85,21/92,03	89,90/94,38	87,51/91,42	88,44/94,25
	Min/Max	88,90/97,80	82,65/96,62	81,26/95,42	87,11/96,61	85,22/93,68	81,26/97,80
Tb.B.Ar/Tb.Ar/ (%)	Mittelwert	13,19	15,37	17,39	15,13	15,50	15,32
	St.Dev.	4,87	3,56	2,72	3,45	2,33	4,14
	Median	13,00	14,79	17,03	14,78	15,41	15,15
	1./3. Quartile	10,40/15,93	12,73/18,20	16,23/19,17	13,27/18,32	13,17/17,39	12,70/17,99
	Min/Max	3,32/22,64	9,57/23,13	11,84/22,66	9,75/20,57	12,40/19,13	3,32/23,13

Auch bei den Rippenpräparaten zeigten sich signifikante Differenzen beim Vergleich der mineralisierten Knochenflächen ( $p = 0,022$ ) in Placebo und GH-Gruppe mit Werten von 67,78 % (59,95 % - 72,13 %) respektive 64,46 % (57,43 % - 72,41 %). Auch hier fanden sich signifikante Unterschiede zwischen dorsal, mittig und ventral ( $p < 0,001$ ), wobei die Knochendichte dorsal am höchsten, ventral am niedrigsten war unabhängig von der Gruppenzuordnung (s. Abb. 3.2-4).



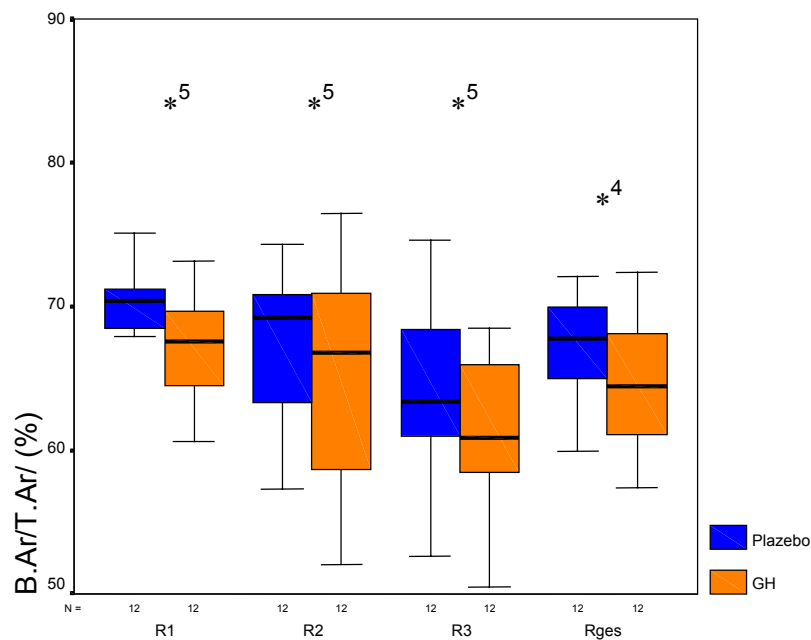


Abbildung 3.2-4: Anteil mineralisierter Knochenfläche an der Gesamtknochenfläche (B.Ar/T.Ar),  $p^{*4} = 0,022$ ,  $p^{*5} < 0,001$

Nach Unterteilung der Gesamtknochenfläche in eine kortikale und eine spongiöse Fläche ergaben sich bei den Wirbelkörpern für die Kortikalis anteilig Werte von 14,48 % (11,93 % - 17,96 %) für die Placebotiere und 12,33 % (10,58 % - 17,60 %) für die Wachstumshormontiere, was einem trabekulären Anteil von 85,52 % (82,04 % - 88,07 %) respektive 87,67 % (82,40 % - 89,42 %) entsprach. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt (s. Abb. 3.2-5, Abb. 3.2-7).

Diese ergaben sich jedoch beim Vergleich der Beckenkammbiopsien ( $p < 0,001$ ) mit kortikalen Werten von 15,90 % (10,54 % - 18,87 %) in der Kontrollgruppe und signifikant höheren 21,12 % (13,71 % - 30,61 %) in der Behandlungsgruppe, was trabekulär 84,10 % (81,13 % - 89,46 %) bzw. 78,88 % (69,39 % - 86,29 %) entsprach (s. Abb. 3.2-5, Abb. 3.2-7).

Bei den Rippen ließ sich wiederum keine signifikante Differenz aufzeigen. Die Werte betrugen kortikal 68,68 % (57,30 % - 74,55 %) in der Placebogruppe sowie 65,31 % (55,30 % - 74,19 %) in der GH-Gruppe, was 31,32 % (25,45 % - 42,70 %) respektive 34,69 % (25,81 % - 44,70 %) trabekulär entsprach. Untereinander verglichen wiesen die drei Lokalisationen unabhängig von der Gruppenzuordnung wieder statistisch signifi-

kante Differenzen auf ( $p = 0,005$ ), wobei der dorsale Schnitt den höchsten, der ventrale Schnitt den niedrigsten Kortikalisanteil zeigte (s. Abb. 3.2-6, Abb. 3.2-8).

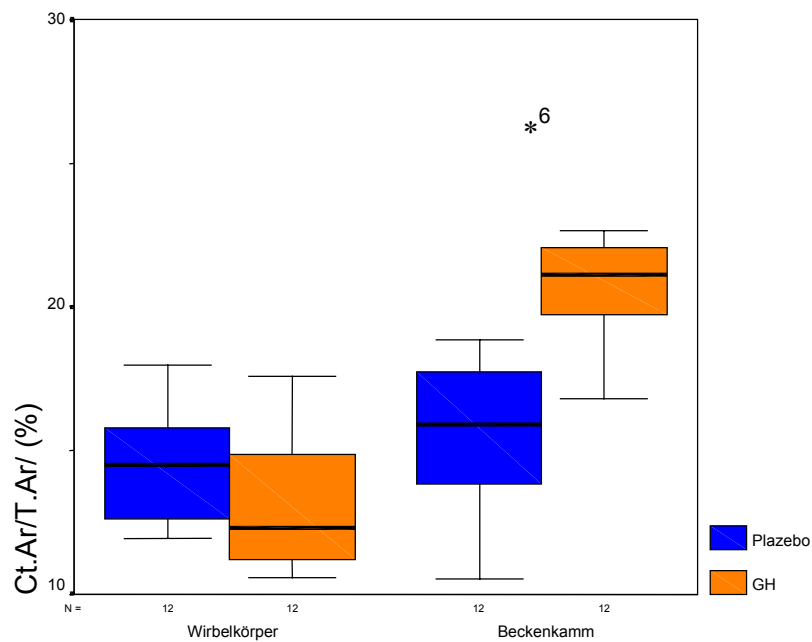


Abbildung 3.2-5: Anteil der Kortikalisfläche an der Gesamtfläche (Ct.Ar/T.Ar),  $p^{*6} < 0,001$

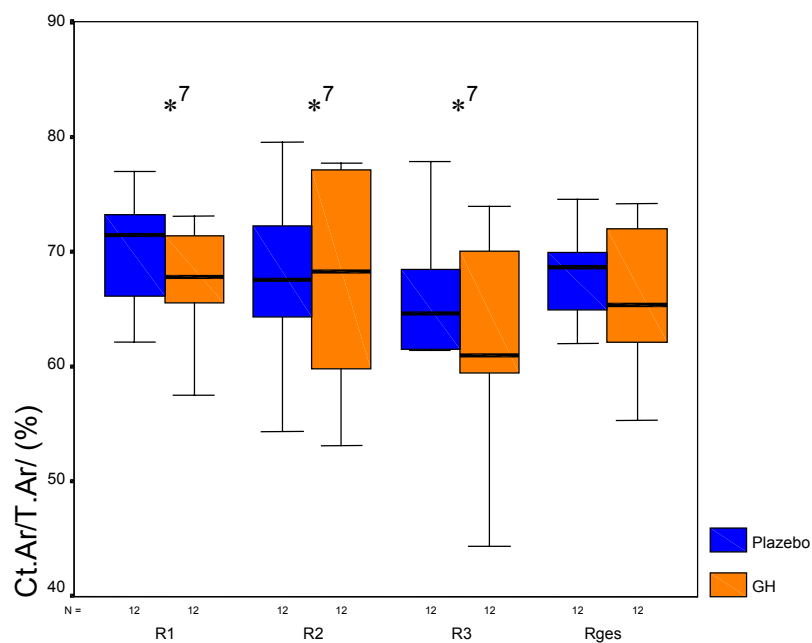


Abbildung 3.2-6: Anteil der Kortikalisfläche an der Gesamtfläche (Ct.Ar/T.Ar),  $p^{*7} = 0,005$

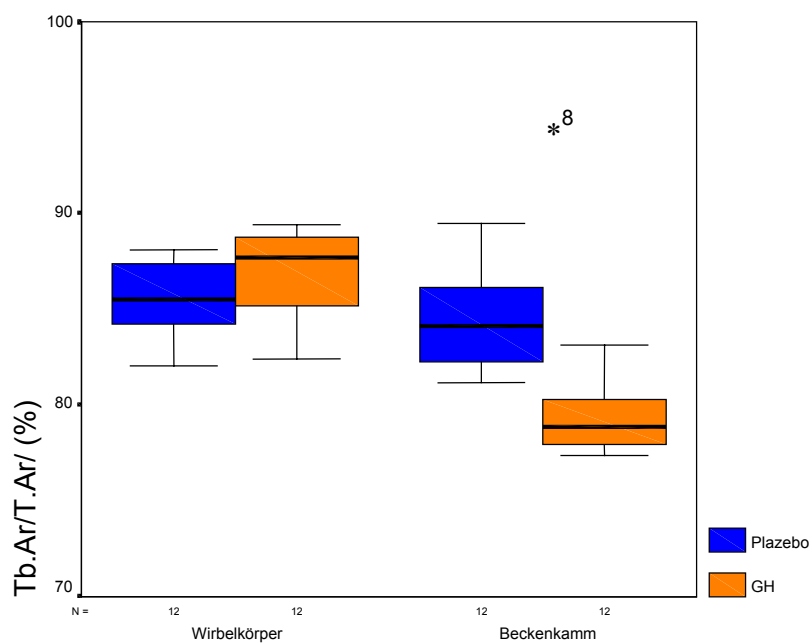


Abbildung 3.2-7: Anteil der Trabekelfläche an der Gesamtfläche (Tb.Ar/T.Ar),  $p^{*8} < 0,001$

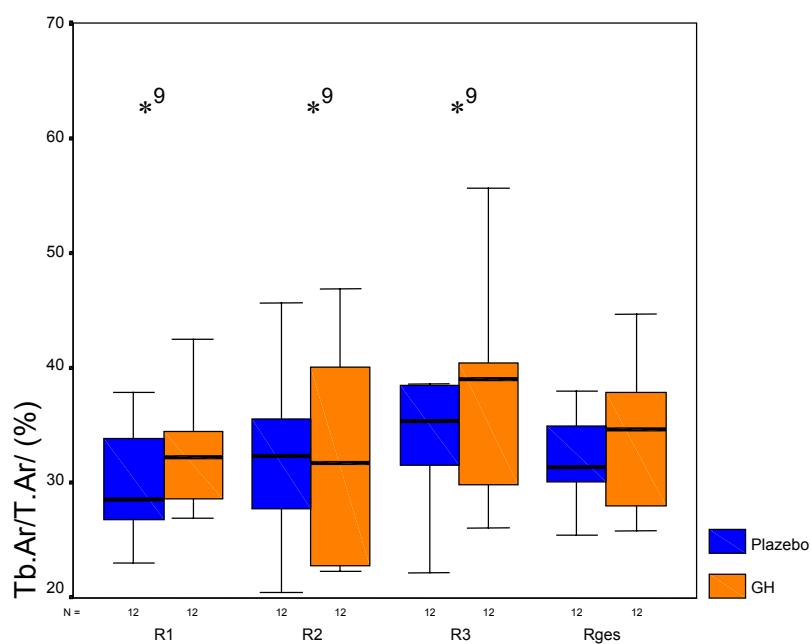


Abbildung 3.2-8: Anteil der Trabekelfläche an der Gesamtfläche (Tb.Ar/T.Ar),  $p^{*9} = 0,005$

Nach dieser Einteilung der Gesamtknochenfläche in eine kortikale und eine spongiöse Fläche wurde auch erkennbar, dass der prozentuale knöcherne Anteil der kortikalen Fläche („kortikale Knochendichte“) an allen 3 Lokalisationen signifikante Differenzen zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe aufwies (s. Abb. 3.2-9, Abb. 3.2-10). So betrug er bei den Wirbelkörpern 75,03 % (71,74 % - 85,03 %) bei den unbehandelten Tieren und nur 70,10 % (62,07 % - 74,56 %) bei den behandelten Tieren ( $p < 0,001$ ).

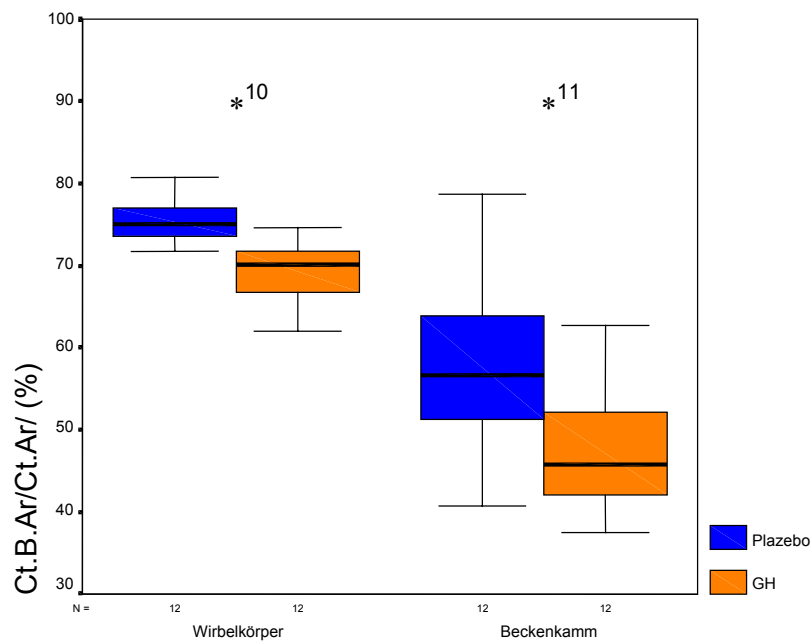


Abbildung 3.2-9: Anteil des kortikalen Knochens an der Kortikalisfläche (Ct.B.Ar/Ct.Ar),  
 $p^{*10} < 0,001$ ,  $p^{*11} = 0,012$

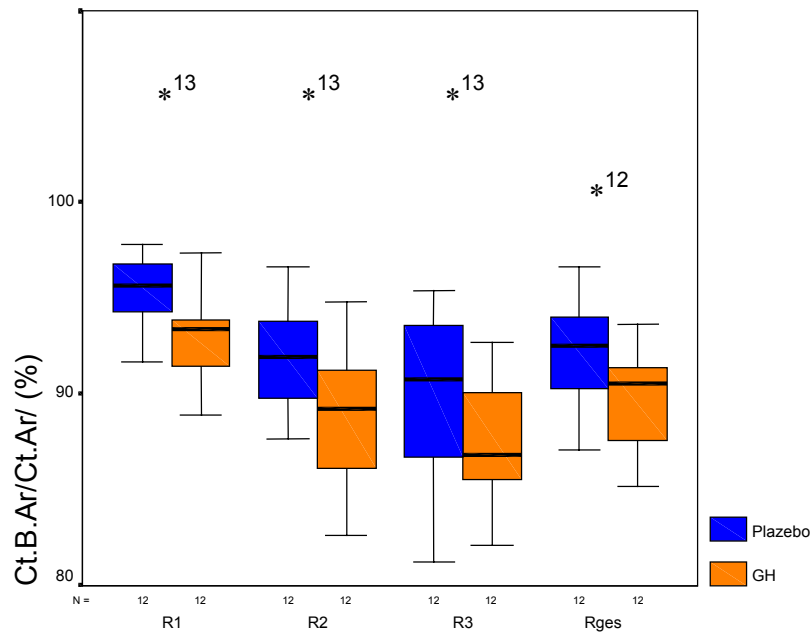


Abbildung 3.2-10: Anteil des kortikalen Knochens an der Kortikalisfläche (Ct.B.Ar/Ct.Ar),  
 $p^{*12} = 0,007$ ,  $p^{*13} < 0,001$

Für die Beckenkammpräparate ergaben sich Werte von 56,65 % (40,74 % - 78,74 %) bei den Placebotieren und wiederum niedrigere 45,73 % (37,55 % - 62,74 %) bei den Wachstumshormontieren ( $p = 0,012$ ). An den Rippen wurden Werte von 92,53 % (87,11 % - 96,61 %) an den Placebopräparaten und 90,53 % (85,22 % - 93,68 %) an den Hormonpräparaten gemessen ( $p = 0,007$ ). Auch hier lagen gruppenunabhängig signifikante Unterschiede zwischen dorsal, mittig und ventral vor ( $p < 0,001$ ), wobei die dorsalen Werte wieder am höchsten, die ventralen am niedrigsten lagen. Die Differenz zu hundert entspricht der Porosität des Knochens, welche somit bei den Placebotieren signifikant niedriger ist als bei den Wachstumshormontieren.

Für die knöcherne Trabekelfläche wurden bei den Wirbelpräparaten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt ( $p = 0,017$ ). Dort maßen die Werte in der Kontrollgruppe 28,63 % (22,47 % - 32,06 %) und in der Behandlungsgruppe 24,07 % (20,17 % - 28,42 %). Werte von 17,10 % (13,91 % - 23,88 %) bzw. 16,54 % (11,71 % - 20,49 %) bei den Placebo bzw. Wachstumshormontieren an den Beckenkammpräparaten ließen keine statistisch signifikante Differenz erkennen (s. Abb. 3.2-11). Für die Rippen ergaben sich mit Werten von 14,78 % (9,75 % - 20,57 %) bei den nicht behandelten Tieren und 15,41 % (12,40 % - 19,13 %) bei den behandelten Tieren ebenfalls keine

signifikanten Unterschiede. Allerdings unterschieden sich die drei Entnahmestellen wiederum signifikant ( $p < 0,001$ ), wobei dorsal die trabekuläre Knochendichte am geringsten war, ventral am höchsten unabhängig von der Behandlungsart (s. Abb. 3.2-12).

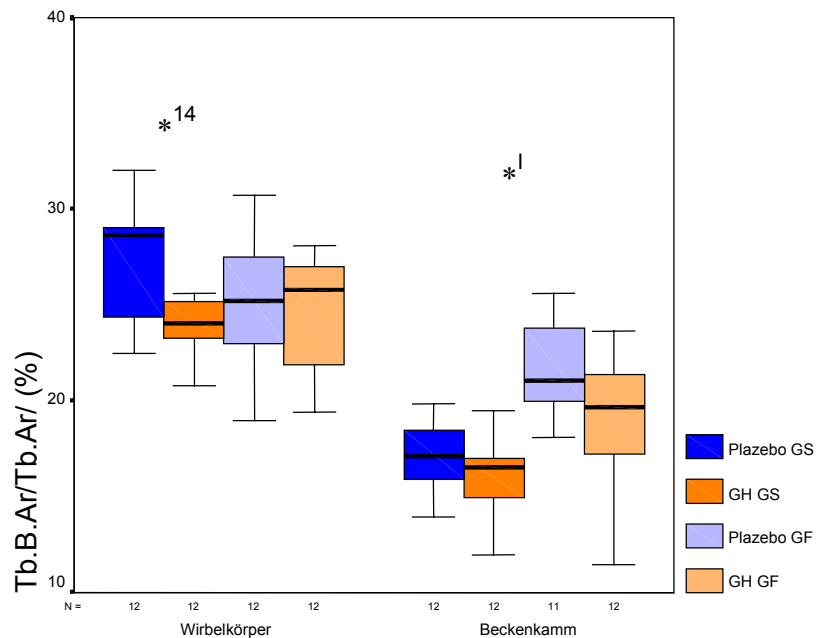


Abbildung 3.2-11: Anteil des trabekulären Knochens an der Trabekelfläche (Tb.B.Ar/Tb.Ar),  
 $p^{*14} = 0,017$ ,  $p^{*I} < 0,001$ ;

GS – Gesamtschnittmessung, GF – Gesichtsfeldmessung

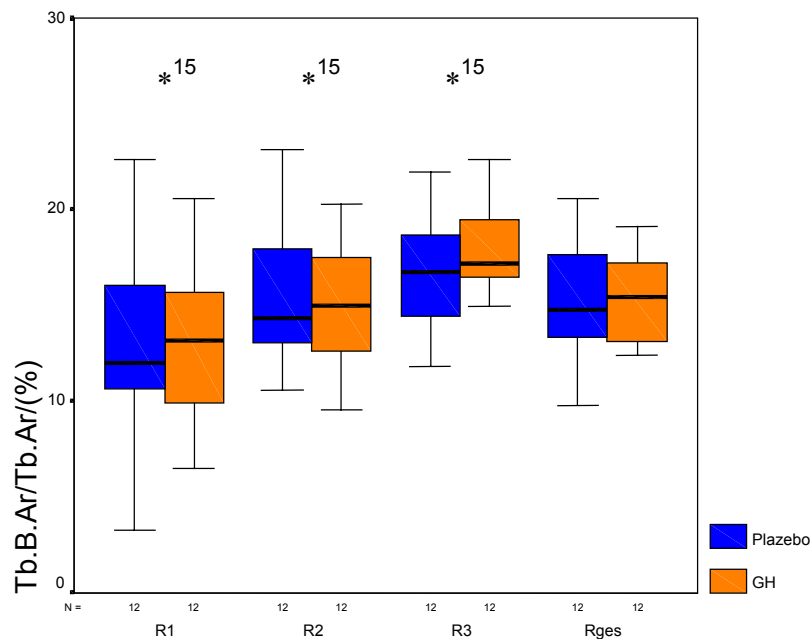
Mit der Messmethode anhand von Gesichtsfeldern (GF) konnten weder an Wirbeln noch an Iliakalbiopsien signifikante Unterschiede der trabekulären Knochenfläche aufgezeigt werden. Für die Wirbel ergab sich ein trabekulärer Knochenanteil von 25,24 % (18,96 % - 30,72 %) und 25,79 % (19,39 % - 28,07 %) für Kontroll- und Behandlungsgruppe respektive. Die Beckenkammbiopsien wiesen hier einen Anteil von 21,06 % (18,10 % - 25,62 %) bei den Placebotieren und 16,69 % (11,45 % - 23,66 %) bei den hormonbehandelten Tieren auf (s. Abb. 3.2-11).

Vergleich man nun die ermittelten Werte beider Methoden miteinander, so zeigte sich kein signifikanter Unterschied beider Methoden an den Wirbelkörpern mit Werten von 25,01 % (20,17 % - 32,06 %) am Gesamtschnitt (GS) und 25,62 % (18,96 % - 30,72 %) anhand von Gesichtsfeldern bei einer ähnlichen Spannweite. Anders verhielt es sich bei den Iliakalbiopsien, wo bei Werten von 16,61 % (11,71 % - 23,88 %) gemessen am Ge-

samtpräparat und 20,78 % (11,45 % - 25,62 %) an Gesichtsfeldern ein signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte ( $p < 0,001$ ) (s. Abb. 3.2-11).

**Tabelle 3.2-7:** Deskriptive Statistik, Knochenmikrostruktur von Wirbelkörper und Beckenkamm, Gesichtsfeldmessung, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Wirbelkörper und Beckenkämme Gesichtsfeld		Wirbelkörper			Beckenkamm		
		Placebo	GH	Total	Placebo	GH	Total
		n=12	n=12	n=24	n=12	n=12	n=24
Tb.B.Ar/Tb.Ar/ (%)	Mittelwert	25,26	24,50	24,88	21,60	18,94	20,21
	St.Dev.	3,53	3,13	3,29	2,54	3,52	3,32
	Median	25,24	25,79	25,62	21,06	19,69	20,78
	1./3. Quartile	22,48/28,15	21,62/27,08	22,04/27,08	19,77/24,27	16,88/21,38	18,10/22,14
	Min/Max	18,96/30,72	19,39/28,07	18,96/30,72	18,10/25,62	11,45/23,66	11,45/25,62
Tb.Wi/ (µm)	Mittelwert	103,09	97,16	100,12	104,95	102,23	103,53
	St.Dev.	7,87	4,92	7,10	13,05	12,78	12,69
	Median	104,09	96,89	100,64	108,12	101,71	104,74
	1./3. Quartile	97,38/109,42	94,28/100,79	94,42/105,11	92,75/112,02	91,18/110,60	92,64/112,02
	Min/Max	89,43/112,96	87,71/105,35	87,71/112,96	80,34/128,80	85,30/131,41	80,34/131,41



**Abbildung 3.2-12:** Anteil des trabekulären Knochens an der Trabekelfläche (Tb.B.Ar/Tb.Ar),  $p^{*15} < 0,001$

Die oben beschriebene Messung der Trabekeldicken am Gesamtpräparat ergab für die Wirbelkörperschnitte im Mittel 223,34 µm (190,60 µm - 250,07 µm) in der Kontrollgruppe sowie 202,44 µm (187,73 µm – 226,67 µm) in der Behandlungsgruppe, was sig-

nifikant breitere Trabekel in der Placebogruppe zeigte ( $p = 0,014$ ). An den Iliakalbiopsien wurden Werte von  $134,23 \mu\text{m}$  ( $119,17 \mu\text{m} - 204,00 \mu\text{m}$ ) bei den Kontrolltieren und  $126,63 \mu\text{m}$  ( $116,49 \mu\text{m} - 138,07 \mu\text{m}$ ) bei den hormonbehandelten Tieren ermittelt, welche keine statistisch signifikante Differenz aufzeigte (s. Abb. 3.2-13). Die Spannweite erwies sich sowohl an den Wirbeln wie auch an den Beckenkämmen in der Kontrollgruppe als wesentlich größer als in der Behandlungsgruppe.

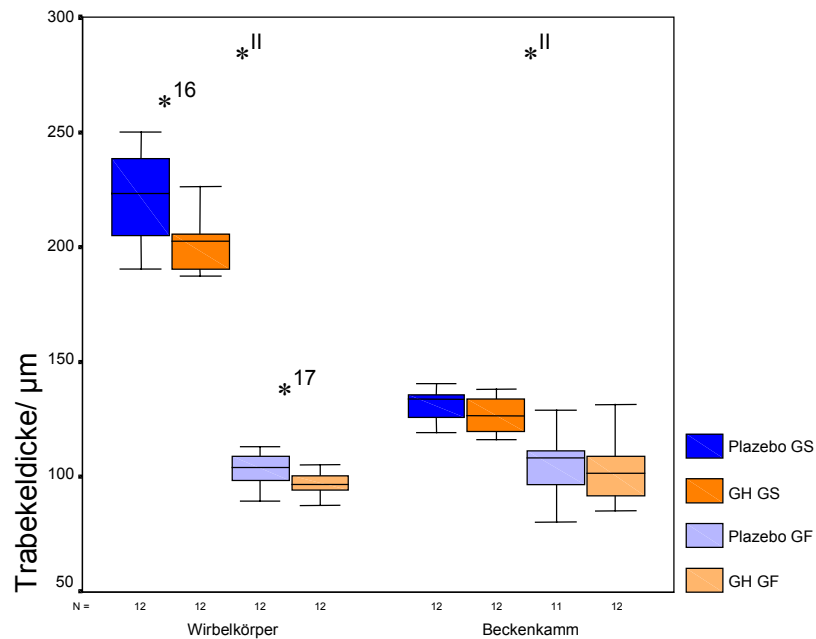


Abbildung 3.2-13: Trabekeldicke (Tb.Wi) in  $\mu\text{m}$ , beide Methoden,  $p^{*16} = 0,014$ ,  $p^{*17} = 0,024$ ,  $p^{*II} < 0,001$

Bei der Messung an Gesichtsfeldern wurden ebenfalls an den Wirbelkörpern signifikante Unterschiede zwischen GH- und Placebogruppe ermittelt ( $p = 0,024$ ), allerdings mit insgesamt geringeren Werten von  $104,09 \mu\text{m}$  ( $89,43 \mu\text{m} - 112,96 \mu\text{m}$ ) bei den Placebotieren und  $96,89 \mu\text{m}$  ( $87,71 \mu\text{m} - 105,35 \mu\text{m}$ ) bei den Wachstumshormontieren. Wiederum keine Signifikanzen zeigten sich zwischen den Gruppen an den Iliakalbiopsien, wo mit dieser Methode Werte von  $108,12 \mu\text{m}$  ( $80,34 \mu\text{m} - 128,80 \mu\text{m}$ ) und  $101,71 \mu\text{m}$  ( $85,30 \mu\text{m} - 131,41 \mu\text{m}$ ) in der Kontroll- respektive Behandlungsgruppe gemessen wurden (s. Abb. 3.2-13).

Beim Vergleich der Methoden wurde augenfällig, dass sie sich signifikant unterschieden ( $p < 0,001$ ) mit wesentlich höheren Ergebnissen bei der automatisierteren Messung.



Die Kortikalisdicke der Rippen betrug 1,00 mm (0,76 mm – 1,24 mm) in der Kontroll- und 0,94 mm (0,85 mm – 1,11 mm) in der Behandlungsgruppe und zeigte damit keine signifikanten Differenzen.

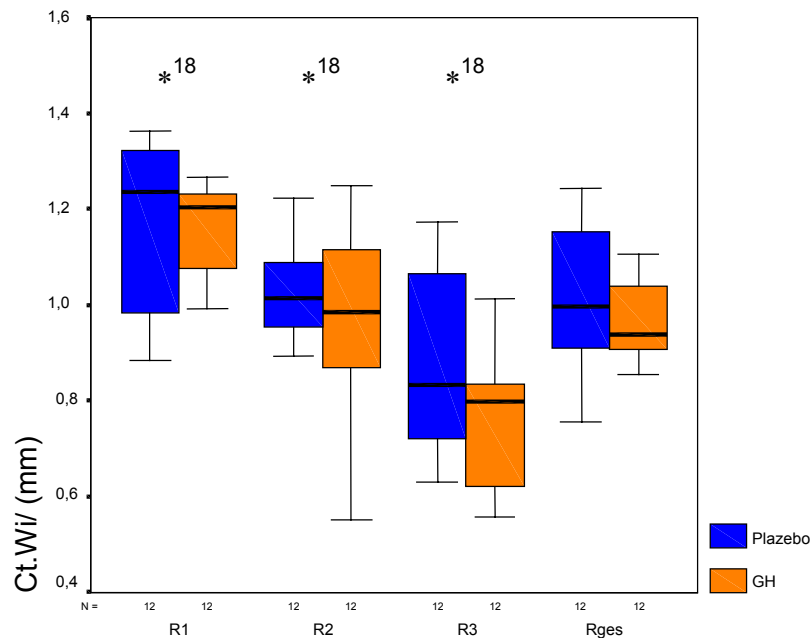


Abbildung 3.2-14: Kortikalisdicke (Ct.Wi) in mm,  $p^{*18} < 0,001$

Vergleich man die 3 Lokalisationen dorsal, mittig, ventral zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) mit den höchsten Werten dorsal und den niedrigsten Werten ventral unabhängig von der Behandlungsart (s. Abb. 3.2-14).

### 3.2.2 Remodellierungsparameter

**Tabelle 3.2-8:** Deskriptive Statistik, Gesichtsfeldmessung an Wirbelkörpern und Beckenkämmen, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Wirbelkörper und Beckenkamm Knochenumbau		Wirbelkörper			Beckenkamm		
		Placebo	GH	Total	Placebo	GH	Total
		n=12	n=12	n=24	n=12	n=12	n=24
B.Pm/(mm)	Mittelwert	3,98	3,87	3,93	3,75	3,54	3,64
	St.Dev.	0,31	0,31	0,31	0,37	0,49	0,44
	Median	3,98	4,00	4,00	3,67	3,61	3,65
	1./3. Quartile	3,69/4,26	3,65/4,06	3,69/4,10	3,43/4,08	3,13/3,97	3,39/3,99
	Min/Max	3,56/4,57	3,24/4,16	3,24/4,57	3,25/4,39	2,54/4,22	2,54/4,39
Erosion/(%)	Mittelwert	11,68	12,66	12,17	9,30	13,66	11,68
	St.Dev.	1,99	2,10	2,06	1,92	2,48	3,12
	Median	12,26	13,04	12,52	9,54	13,28	11,47
	1./3. Quartile	9,84/13,14	10,66/14,26	10,33/13,53	7,32/10,43	12,08/15,10	9,55/13,83
	Min/Max	8,69/14,37	9,19/16,23	8,69/16,23	6,61/12,95	9,66/17,81	6,61/17,81
Oc.Pm/B.Pm/(%)	Mittelwert	5,08	6,84	5,96	4,26	6,76	5,62
	St.Dev.	0,95	1,31	1,44	1,02	1,96	2,02
	Median	5,05	7,05	5,92	4,22	6,03	5,35
	1./3. Quartile	4,27/5,87	6,07/7,56	4,74/7,05	3,56/5,02	5,61/7,99	4,35/6,13
	Min/Max	3,73/6,80	3,97/8,90	3,73/8,90	2,47/6,05	4,65/11,64	2,47/11,64
E.Pm/B.Pm/(%)	Mittelwert	6,25	6,09	6,17	5,07	6,71	5,96
	St.Dev.	1,41	1,61	1,48	1,48	1,69	1,77
	Median	6,24	6,46	6,32	4,99	6,50	5,86
	1./3. Quartile	5,05/7,25	4,72/7,16	5,05/7,25	4,06/5,92	5,40/8,21	4,49/7,05
	Min/Max	4,11/8,31	3,40/8,94	3,40/8,94	2,99/8,10	4,34/9,33	2,99/9,33
Formation/(%)	Mittelwert	10,04	14,55	12,29	16,49	22,88	19,98
	St.Dev.	4,29	4,79	5,01	5,73	7,06	7,13
	Median	10,41	14,23	12,56	16,88	24,40	17,68
	1./3. Quartile	6,11/13,71	10,98/18,48	7,96/15,38	10,85/20,77	15,72/28,85	14,78/27,73
	Min/Max	3,68/17,62	6,15/23,07	3,68/23,07	9,13/27,66	11,97/33,69	9,13/33,69
Ob.Pm/B.Pm/(%)	Mittelwert	5,25	8,03	6,64	8,96	16,10	12,86
	St.Dev.	3,11	4,81	4,21	4,03	5,44	5,98
	Median	3,75	8,56	6,20	9,51	15,62	11,33
	1./3. Quartile	2,75/7,53	3,80/11,96	3,20/8,80	5,66/10,97	11,19/21,76	9,30/18,16
	Min/Max	2,07/12,08	0,36/16,58	0,36/16,58	2,20/16,43	7,76/22,71	2,20/22,71
O.Pm/B.Pm/(%)	Mittelwert	4,78	4,87	4,83	6,28	5,91	6,08
	St.Dev.	2,61	1,55	2,10	3,62	3,32	3,38
	Median	5,11	4,43	4,78	4,85	5,50	5,23
	1./3. Quartile	2,29/6,45	3,73/5,48	3,23/6,33	3,64/8,95	3,33/8,75	3,51/8,60
	Min/Max	1,19/10,25	3,21/8,62	1,19/10,25	1,97/12,58	0,99/11,08	0,99/12,58
Um-fang/(%)	Mittelwert	78,28	72,79	75,53	74,20	63,46	68,34
	St.Dev.	3,69	4,03	4,71	5,93	7,46	8,62
	Median	79,16	72,67	75,51	75,98	63,42	70,60
	1./3. Quartile	76,13/81,24	69,63/74,81	72,35/80,50	69,72/78,43	57,83/71,01	61,88/75,93
	Min/Max	69,61/81,96	66,83/80,29	66,83/81,96	62,47/82,39	51,13/73,16	51,13/82,39

Im folgenden werden die Ergebnisse der Messungen zur Beschreibung des Knochenumbaus in der natürlich auftretenden Reihenfolge Resorption, Formation, Ruhephase beschrieben.

Der in Resorptionsvorgängen begriffene prozentuale Anteil des Trabekelumfangs betrug 12,26 % (8,69 % - 14,37 %) bzw. 13,04 % (9,19 % - 16,23 %) an den Wirbelkörperpräparaten der Placebo- respektive GH-Tiere, was keinen statistisch signifikanten Unterschied darstellt (s. Abb. 3.2-15).

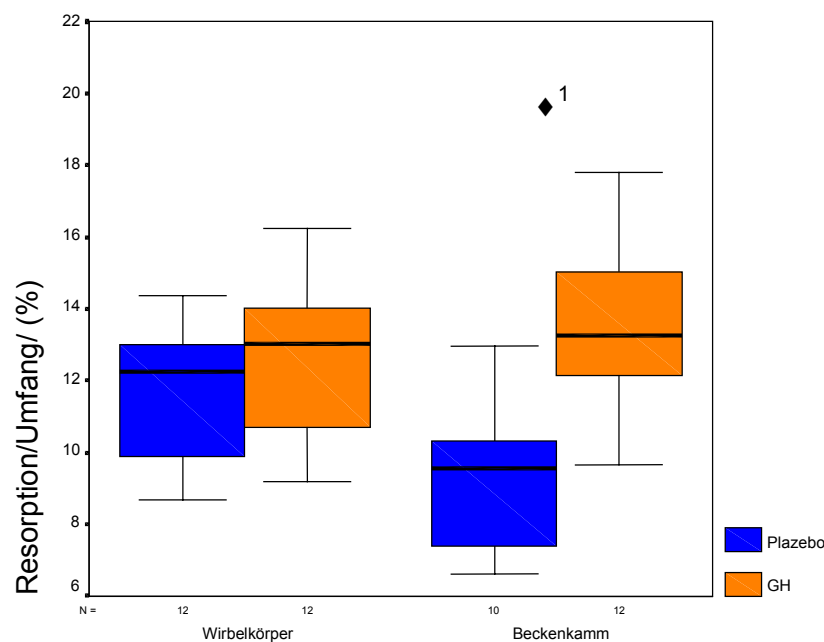


Abbildung 3.2-15: Knochenresorption als prozentualer Anteil des Knochenumfangs, welcher mit Howship'schen Lakunen bedeckt ist, die entweder leer oder mit Osteoklasten gefüllt sind,  $p^{♦1} < 0,001$

Hingegen erwiesen sich die Werte von 9,54 % (6,61 % - 12,95 %) und 13,28 % (9,66 % - 17,81 %) an den Beckenkammpräparaten für Kontroll- und Behandlungsgruppe als signifikant verschieden ( $p < 0,001$ ).

Differenzierte man zwischen aktiver Resorption, welche durch Anwesenheit von Osteoklasten gekennzeichnet ist, und nicht aktiver, d.h. bereits stattgehabter Resorption, erkennbar an leeren Howship'schen Lakunen, so zeigte der prozentuale Anteil der mit Osteoklasten bedeckten Oberfläche sowohl bei den Wirbelkörpern als auch bei den Beckenkammbiopsien signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen (s. Abb. 3.2-16).

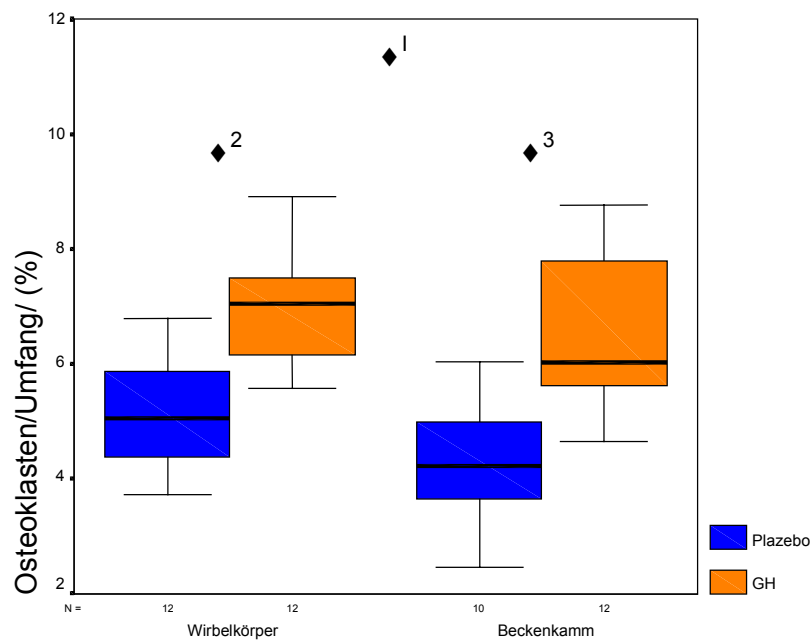


Abbildung 3.2-16: Aktive Knochenresorption als prozentualer Anteil des Knochenumfangs, welcher mit von Osteoklasten gefüllten Howship'schen Lakunen bedeckt ist,  $p^{♦2} = 0,001$ ,  $p^{♦3} < 0,001$ ,  $p^{♦1} = 0,039$

Die ermittelten Werte betrugen an den Wirbelpräparaten 5,05 % (3,73 % - 6,80 %) für die Kontrolltiere respektive 7,05 % (3,97 % - 8,90 %) für die hormonbehandelten Tiere ( $p = 0,001$ ), an den Iliakalpräparaten 4,22 % (2,47 % - 6,05 %) in der Placebogruppe und 6,03 % (4,65 % - 11,64 %) in der Wachstumshormongruppe ( $p < 0,001$ ).

Die Unterschiede des prozentualen Anteils des von leeren Howship'schen Lakunen bedeckten Umfangs zwischen den Gruppen erwiesen sich hingegen nur für die Beckenkammpräparate mit Werten von 4,99 % (2,99 % - 8,10 %) in der Kontrollgruppe und 6,50 % (4,34 % - 9,33 %) in der Behandlungsgruppe als signifikant ( $p = 0,025$ ), nicht jedoch für die Wirbelkörper, deren Werte dieser Messung bei 6,24 % (4,11 % - 8,31 %) respektive 6,46 % (3,40 % - 8,94 %) für Placebo und GH-Gruppe lagen (s. Abb. 3.2-17).

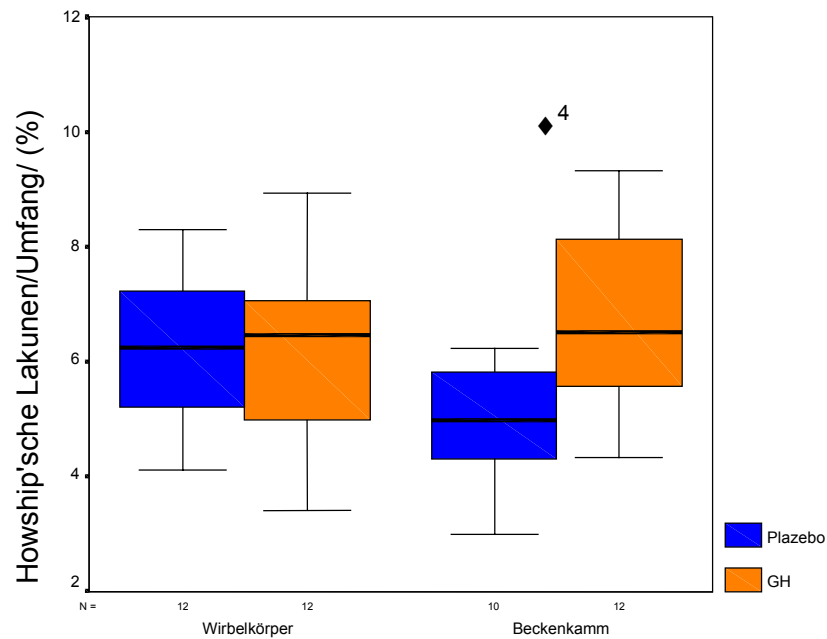


Abbildung 3.2-17: Passive Knochenresorption als prozentualer Anteil des Knochenumfangs, welcher mit leeren Howship'schen Lakunen bedeckt ist,  $p^{\diamond 4} = 0,025$

Betrachtete man die Formationsphase, die sich zusammensetzte aus ruhendem Osteoid und von Osteoblasten bedecktem aktivem Osteoid, waren ebenfalls bereits nach kurzer Behandlungszeit Unterschiede nachzuweisen (s. Abb. 3.2-18). Der prozentuale Anteil des in Formation befindlichen Umfangs am Gesamtumfang zeigte an beiden Lokalisationen signifikant höhere Werte bei den Wachstumshormontieren als bei den Placebotieren, wobei der Anteil bei den Wirbelkörpern 10,41 % (3,68 % - 17,62 %) in der Kontrollgruppe bzw. 14,23 % (6,15 % - 23,07 %) in der Behandlungsgruppe betrug ( $p = 0,028$ ), bei den Beckenkämmen 16,88 % (9,13 % - 27,66 %) bzw. 24,40 % (11,97 % - 33,69 %) in Placebo- und GH-Gruppe ( $p = 0,043$ ).

Wurden nun wieder die beiden Anteile dieser Phase getrennt begutachtet, so ließ sich ein signifikanter statistischer Unterschied nur beim Anteil des mit Osteoblasten bedeckten Osteoids an den Iliakalbiopsien aufzeigen ( $p = 0,002$ ), bei Werten von 9,51 % (2,20 % - 16,42 %) in der Kontrollgruppe bzw. 15,62 % (7,76 % - 22,71 %) in der Behandlungsgruppe. An den Wirbelkörpern wurden Werte von 3,75 (2,07 % - 12,08 %) in der Placebogruppe sowie 8,56 % (0,36 % - 16,58 %) in der Wachstumshormongruppe gemessen, welche sich statistisch nicht unterschieden (s. Abb. 3.2-19).

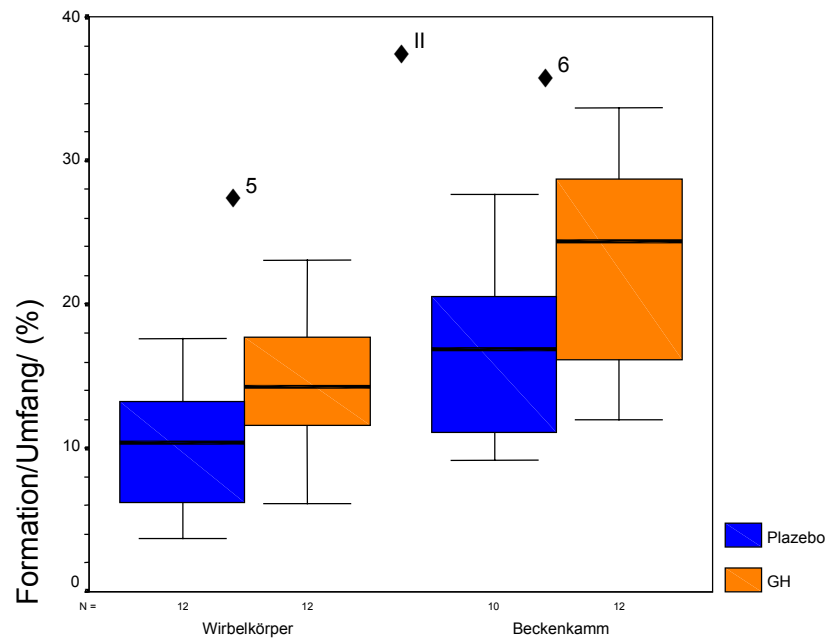


Abbildung 3.2-18: Knochenformation als prozentualer Anteil des Knochenumfangs, welcher mit Osteoid bedeckt ist, auf welchem entweder Osteoblasten oder Knochenbelegzellen bzw. keine Zellen liegen,  $p^{\text{5}} = 0,028$ ,  $p^{\text{6}} = 0,043$ ,  $p^{\text{II}} = 0,001$

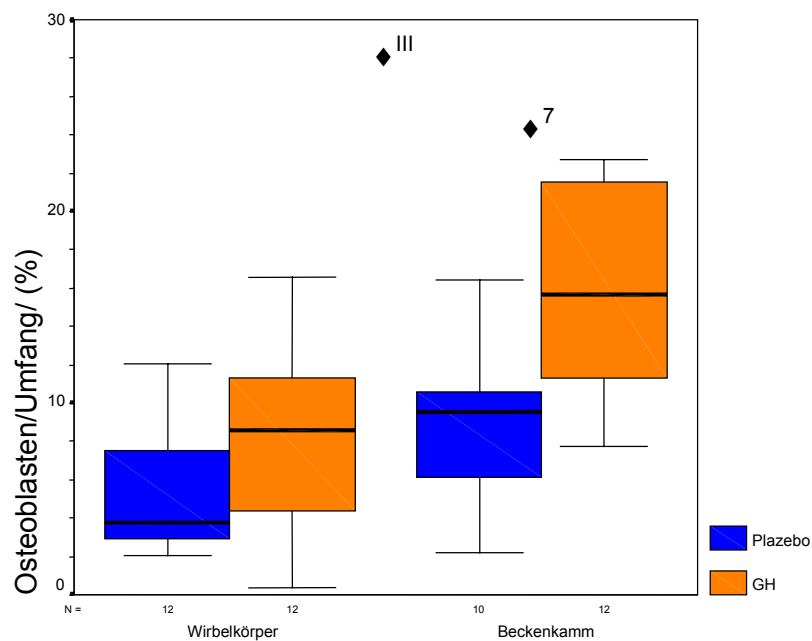


Abbildung 3.2-19: Aktive Knochenformation als prozentualer Anteil des Knochenumfangs, welcher mit von Osteoblasten bedecktem Osteoid bedeckt ist,  $p^{\text{I}} = 0,002$ ,  $p^{\text{III}} < 0,001$

Der von Osteoid ohne Osteoblasten bedeckte Anteil des Knochenumfangs zeigte weder an den Wirbelpräparaten mit Werten von 5,11 % (1,19 % - 10,25 %) bei den Placebotieren und 4,43 % (3,21 % - 8,62 %) bei den Wachstumshormontieren noch an den Beckenkämmen mit Werten von 4,85 % (1,97 % - 12,58 %) und 5,50 % (0,99 % - 11,08 %) respektive signifikante Differenzen (s. Abb. 3.2-20).

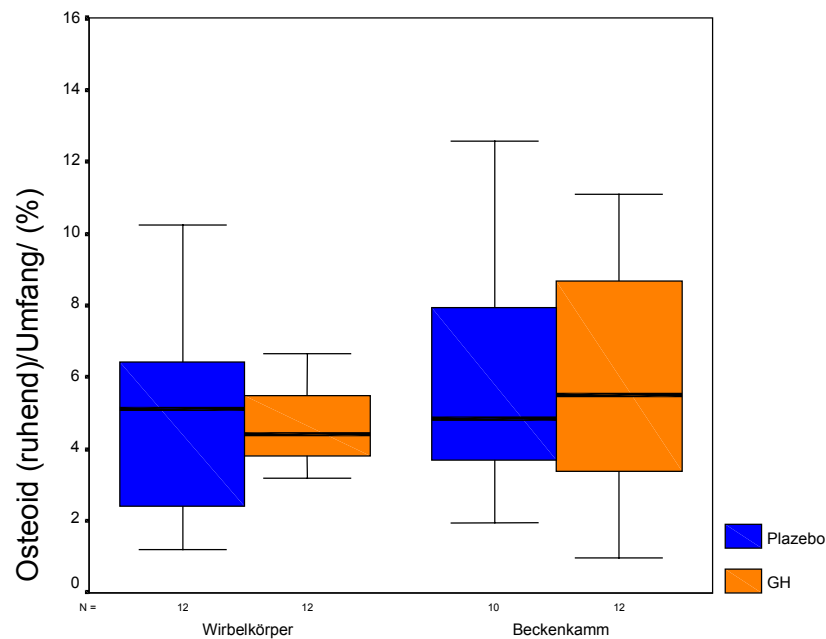


Abbildung 3.2-20: Passive Knochenformation als prozentualer Anteil des Knochenumfangs, welcher mit Osteoid ohne Osteoblasten bedeckt ist, n.s.

Für die ruhende Oberfläche ergaben sich bei den Wirbelkörpern Werte von 79,16 % (69,61 % - 81,96 %) in der Kontrollgruppe und nur 72,67 % (66,83 % - 80,29 %) in der Behandlungsgruppe, was einen signifikanten Unterschied darstellte ( $p = 0,002$ ). Bei den Iliakalbiopsien waren die Werte von 75,98 % (62,47 % - 82,39 %) in der Placebogruppe ebenfalls signifikant höher als die 63,42 % (51,13 % - 73,16 %) in der Hormongruppe ( $p = 0,003$ ) (s. Abb. 3.2-21).

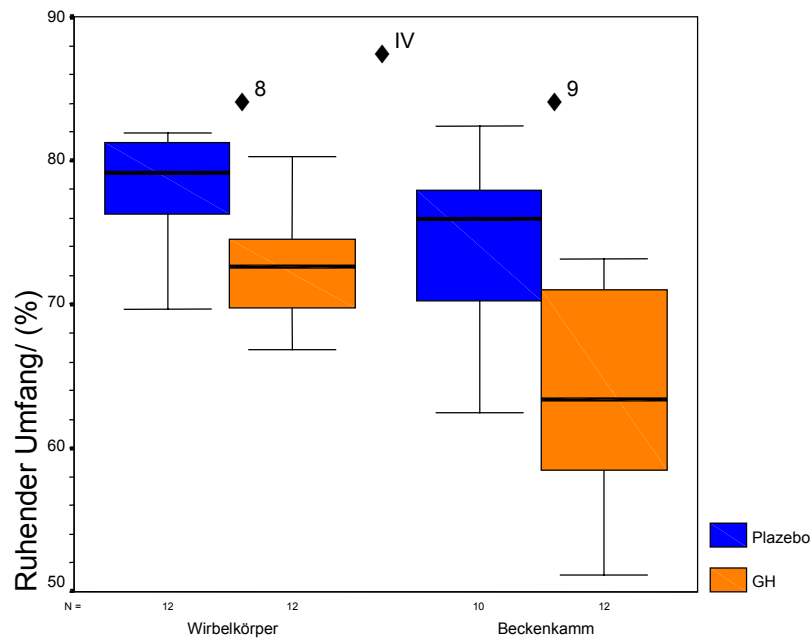


Abbildung 3.2-21: Ruhender Umfang als prozentualer Anteil des Knochenumfangs, welcher Knochenresorptionsanteile noch Knochenformationsanteile zeigt,  $p^{\diamond 8} = 0,002$ ,  $p^{\diamond 9} = 0,003$ ,  $p^{\diamond IV} = 0,001$

Vergleich man nun die Parameter der einzelnen Lokalisationen unabhängig von der Gruppenzuordnung in GH- oder Placebotiere miteinander, erkannte man, dass bei Werten von 12,52 % (8,69 % - 16,23 %) bzw. 11,47 % (6,61 % - 17,81 %) keine signifikanten Unterschiede in der Resorptionsphase zwischen Wirbel und Becken bestanden. Allerdings war der Anteil des von Osteoklasten bedeckten Umfangs an den Wirbeln mit Werten von 5,92 % (3,73 % - 8,90 %) signifikant höher als am Becken mit Werten von 5,35 % (2,47 % - 11,64 %) ( $p = 0,039$ ). Der Anteil der leeren Howship'schen Lakunen differierte zwischen vertebral und iliakal nicht statistisch signifikant bei Werten von 6,32 % (3,40 % - 8,94 %) bzw. 5,86 % (2,99 % - 9,33 %).



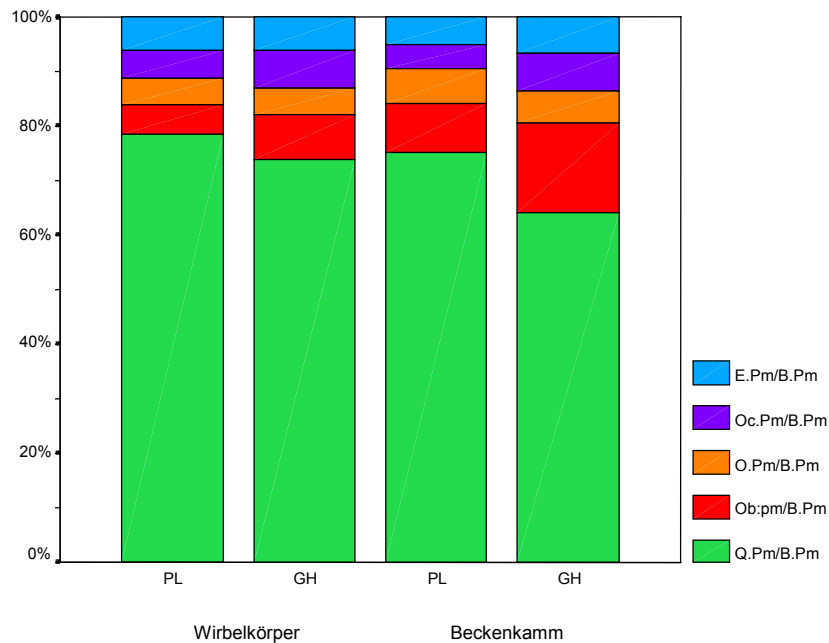


Abbildung 3.2-22: Prozentualer Anteil der einzelnen Umfangsparameter

Der Formationsanteil am Gesamtumfang war bei den Beckenkammpräparaten mit Werten von 17,68 % (9,13 % - 33,69 %) signifikant höher als bei den Wirbelpräparaten mit Werten von 12,56 % (3,68 % - 23,07 %) ( $p = 0,001$ ). Dabei gab vor allem der Anteil an aktivem mit Osteoblasten bedecktem Osteoid den Ausschlag, welcher hier iliakal mit 11,33 % (2,20 % - 22,71 %) signifikant höher lag als vertebral mit 6,20 % (0,36 % - 16,58 %) ( $p < 0,001$ ). Der Anteil inaktiven Osteoids unterschied sich mit Werten von 5,23 % (0,99 % - 12,58 %) iliakal und 4,78 % (1,19 % - 10,25 %) vertebral nicht signifikant zwischen den beiden Lokalisationen.

Als signifikant höher erwies sich der Anteil der ruhenden Oberfläche an Wirbelkörpern als an Beckenkammbiopsien ( $p = 0,001$ ) mit Werten von 75,51 % (66,83 % - 81,96 %) respektive 70,60 % (51,13 % - 82,39 %).

### 3.3 Dynamische Parameter

*Tabelle 3.3-1: Deskriptive Statistik, Mineralapposition an Rippendünnschliffen, Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis*

Rippen Mineralapposition		Placebo n=12	GH n=12	Total n=24
CT/( $\mu\text{m}/\text{d}$ )	Mittelwert	2,21	2,51	2,36
	St.Dev.	0,35	0,26	0,34
	Median	2,29	2,53	2,39
	1./3. Quartile	1,89/2,42	2,28/2,73	2,12/2,62
	Min/Max	1,64/2,79	2,08/2,89	1,64/2,89
TX/( $\mu\text{m}/\text{d}$ )	Mittelwert	1,51	1,83	1,67
	St.Dev.	0,12	0,19	0,23
	Median	1,55	1,84	1,62
	1./3. Quartile	1,38/1,58	1,66/2,03	1,54/1,84
	Min/Max	1,34/1,69	1,57/2,10	1,34/2,10
CX/( $\mu\text{m}/\text{d}$ )	Mittelwert	1,97	2,24	2,11
	St.Dev.	0,26	0,28	0,30
	Median	2,04	2,18	2,12
	1./3. Quartile	1,70/2,14	2,05/2,46	1,88/2,32
	Min/Max	1,53/2,38	1,85/2,68	1,53/2,68
CT/( $\mu\text{m}^2/\text{d}$ )	Mittelwert	821,68	973,21	897,44
	St.Dev.	218,40	251,73	243,12
	Median	797,33	929,59	840,51
	1./3. Quartile	651,24/940,43	762,53/1187,11	744,20/1148,26
	Min/Max	517,83/1197,80	580,16/1336,29	517,83/1336,29
TX/( $\mu\text{m}^2/\text{d}$ )	Mittelwert	370,68	434,83	402,76
	St.Dev.	71,39	123,70	104,06
	Median	372,38	408,88	384,25
	1./3. Quartile	328,14/437,23	332,04/534,23	330,84/467,71
	Min/Max	253,00/484,65	270,85/680,43	253,00/680,43
CX/( $\mu\text{m}^2/\text{d}$ )	Mittelwert	654,95	791,13	723,04
	St.Dev.	163,03	212,24	197,72
	Median	627,46	764,91	669,42
	1./3. Quartile	535,61/743,93	620,96/954,83	579,71/908,22
	Min/Max	411,47/935,95	487,65/1163,16	411,47/1163,16

Durch die Art der Messung ergab sich eine verschiedene Anzahl Messwerte pro Tier bzw. auch pro Lokalisation. Dabei wurden im Mittel 11 Messungen pro Tier vorgenommen mit einer Spannweite von 2 bis 21. Pro Schliff konnten im Mittel 3 Messungen erfolgen mit einer Spannweite von 0 bis 14.

Die Mineralappositionsrates betrug für den gesamten Zeitraum in der Placebogruppe 2,04  $\mu\text{m}/\text{d}$  (1,53  $\mu\text{m}/\text{d}$  – 2,38  $\mu\text{m}/\text{d}$ ) und in der Wachstumshormongruppe 2,18  $\mu\text{m}/\text{d}$

(1,85  $\mu\text{m/d}$  – 2,68  $\mu\text{m/d}$ ), was einen statistisch signifikanten Unterschied darstellte ( $p = 0,033$ ) (s. Abb. 3.3-1).

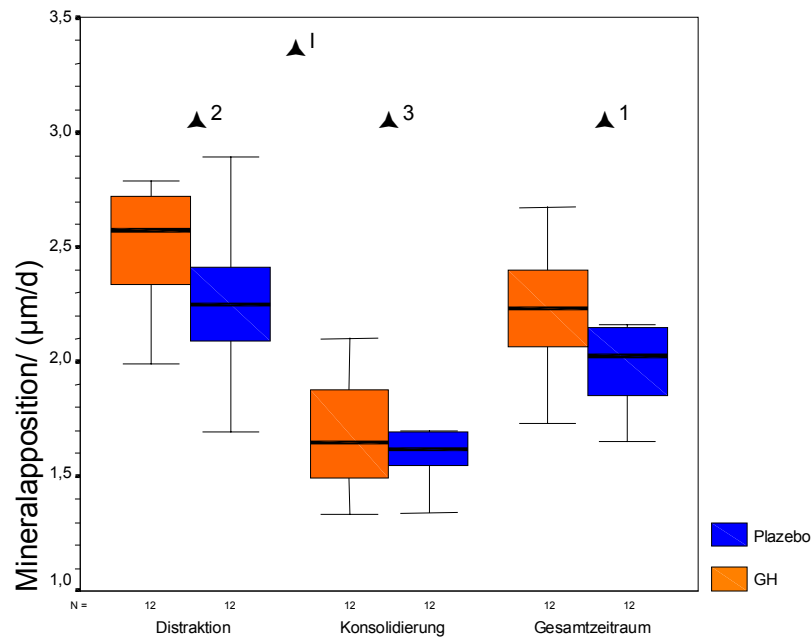


Abbildung 3.3-1: Mineralapposition in  $\mu\text{m/d}$ , gemessen an Rippendünnschliffen,  $p^{\Delta 1} = 0,033$ ,  $p^{\Delta 2} = 0,039$ ,  $p^{\Delta 3} < 0,001$ ,  $p^{\Delta 1} < 0,001$

Auch in den einzelnen Zeiträumen waren die Differenzen signifikant. So lagen die Werte in der Distraktionsphase bei 2,29  $\mu\text{m/d}$  (1,64  $\mu\text{m/d}$  – 2,79  $\mu\text{m/d}$ ) bzw. 2,53  $\mu\text{m/d}$  (2,08  $\mu\text{m/d}$  – 2,89  $\mu\text{m/d}$ ) in Kontroll- und Behandlungsgruppe ( $p = 0,039$ ). In der Konsolidierungsphase wurden mit Werten von 1,55  $\mu\text{m/d}$  (1,34  $\mu\text{m/d}$  – 1,69  $\mu\text{m/d}$ ) respektive 1,84  $\mu\text{m/d}$  (1,57  $\mu\text{m/d}$  – 2,10  $\mu\text{m/d}$ ) in Placebo bzw. GH-Gruppe ebenfalls signifikante Unterschiede ermittelt ( $p < 0,001$ ).

Bei der Anbauflächenmessung zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe (s. Abb. 3.3-2).

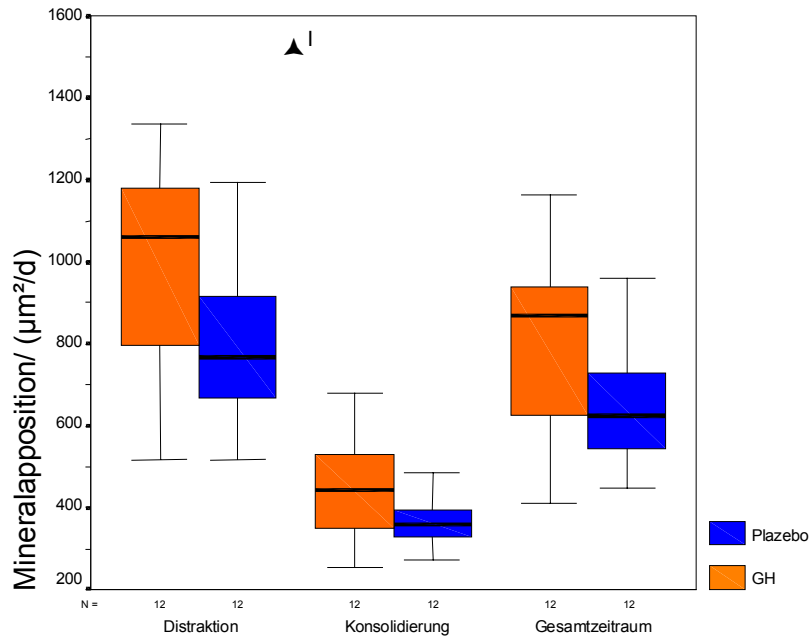


Abbildung 3.3-2: Mineralapposition in  $\mu\text{m}^2/\text{d}$ , gemessen an Rippendünnschliffen,  $p^{\Delta} < 0,001$

Weder die Gesamtwerte von  $627,46 \mu\text{m}^2/\text{d}$  ( $411,47 \mu\text{m}^2/\text{d} - 935,95 \mu\text{m}^2/\text{d}$ ) bei den Placebotieren bzw.  $764,91 \mu\text{m}^2/\text{d}$  ( $487,65 \mu\text{m}^2/\text{d} - 1163,16 \mu\text{m}^2/\text{d}$ ) bei den Wachstumshormontieren noch die Einzelwerte der Distraktionsphase von  $797,33 \mu\text{m}^2/\text{d}$  ( $517,83 \mu\text{m}^2/\text{d} - 1197,80 \mu\text{m}^2/\text{d}$ ) und  $929,59 \mu\text{m}^2/\text{d}$  ( $580,16 \mu\text{m}^2/\text{d} - 1336,29 \mu\text{m}^2/\text{d}$ ) oder der Konsolidierungsphase von  $372,38 \mu\text{m}^2/\text{d}$  ( $253,00 \mu\text{m}^2/\text{d} - 484,65 \mu\text{m}^2/\text{d}$ ) und  $408,88 \mu\text{m}^2/\text{d}$  ( $270,85 \mu\text{m}^2/\text{d} - 680,43 \mu\text{m}^2/\text{d}$ ) jeweils für Kontroll- bzw. Behandlungsgruppe wiesen statistisch signifikante Differenzen auf.

Vergleich man nun den Knochenanbau in der Distraktionsphase mit dem in der Konsolidierungsphase, so war zu erkennen, dass sowohl die Mineralappositionsrate in  $\mu\text{m}/\text{d}$  als auch in  $\mu\text{m}^2/\text{d}$  in der Distraktionsphase signifikant höher war als in der Konsolidierungsphase ( $p < 0,001$  für beide Messungen).

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 Studiendesign

Bei der Durchführung einer tierexperimentellen Studie ist die Auswahl des geeigneten Tiermodells eine der wichtigsten Entscheidungen. In dieser Studie wurde das Yucatan-Minischwein ausgewählt, da es nicht nur hinsichtlich der Operabilität geeignet ist, sondern insbesondere auch in hormoneller Hinsicht und im Bezug auf den Knochenbau große Ähnlichkeiten mit dem Menschen besitzt. Als einziges Minischwein entspringt es einer natürlich kleinen Schweinerasse und weist somit auch keine Defekte der in diesem Experiment entscheidenden GH-IGF-Achse auf. Größe und Gewicht dieses Schweins sind zum einen verglichen mit anderen Tiermodellen dem Menschen ähnlich und zum anderen für die experimentelle Tierhaltung praktikabel (111,112,340).

Für die durchgeführten histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen zur Beeinflussung des Knochenumbaus durch Wachstumshormon ist der Beobachtungszeitraum verhältnismäßig kurz, da er vom Studiendesign her dem Zeitraum der Distraktionsosteogenese entsprach. Es konnten somit bei einem Behandlungszeitraum von 26 Tagen nur initiale Veränderungen untersucht werden. Dementsprechend finden sich keine geeigneten Studien mit ähnlichem Zeitrahmen zum Vergleich. Andererseits wurde in diesem Zeitraum bei der Distraktionsosteogenese bereits ein deutlicher Effekt des Wachstumshormons gesehen (261).

Die Dosierung des Wachstumshormons liegt mit 100 µg/kg/d in einem Bereich, der in der Humanmedizin sicherlich als hoch betrachtet werden muss. Im Tierexperiment werden z.T. diese hohen Dosen verwendet, um klare und eindeutige Ergebnisse in einem akzeptablen Zeitrahmen zu erzielen. Für die klinische Anwendung muss allerdings geklärt werden, ob bei einer Kurzzeittherapie diese hohen Dosen zur Anwendung kommen können.

Die Anzahl der untersuchten Tiere liegt im Rahmen einer tierexperimentellen Großtierstudie. Aufgrund der Distraction, welche auch systemische Auswirkung hat, wie diese Studie anhand der Mineralappositionsrate zeigt, kann die Placebogruppe nicht als hundertprozentig gesunde Kontrollgruppe betrachtet werden. Beim Vergleich mit anderen Studien zur Beurteilung der erhobenen Werte muss dies in Betracht gezogen werden,

für den Vergleich zwischen den Gruppen zum Nachweis von Unterschieden und Gemeinsamkeiten spielt dies allerdings keine Rolle.

Obwohl zu Beginn der Studie davon ausgegangen war, dass die Tiere ausgewachsen seien, zeigten sich ausnahmslos nicht geschlossene Epiphysenfugen an den Wirbelkörpern sowie nicht vollständig verknöcherte Apophysen am Beckenkamm. Angaben über den Zeitpunkt des Epiphysenfugenschlusses beim Yucatan-Minischwein finden sich in der Literatur nicht und sind auch nicht vom Züchter erhältlich. Ebenso wurde das Gewicht der Schweine nicht im Verlauf sondern nur präoperativ bestimmt. Man muss also davon ausgehen, dass hier noch longitudinales Wachstum stattgefunden hat. Damit kann man auch vermuten, dass für den verstärkten ventralen subperiostalen Knochenanbau am Wirbelkörper das nicht abgeschlossene Wachstum ursächlich ist, nachgewiesen werden kann dies allerdings unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht. Relativiert wird der Nachteil des verbliebenen, wenn auch beim Alter der Tiere nur noch als marginal anzusehenden Restwachstums durch Untersuchungen, welche unter Bedingungen der Schwerelosigkeit durchgeführt wurden und zeigen konnten, dass sich die Mehrbelastung durch wachstumsbedingte Gewichtszunahme im Verlauf des Versuchs, welcher in diesem Falle auch noch einen sehr kurzen Behandlungszeitraum aufwies, nicht messbar auf die Knochenparameter auswirkte (344). Da dieser Nachteil beide Untersuchungsgruppen betraf, ist er in statistischer Hinsicht vernachlässigbar, beim Vergleich mit anderen Studien allerdings zu beachten.

#### **4.1.2 Histologische Verfahren**

Die Anfertigung der Schnitt- und Schliffpräparate entspricht dem internationalen Standard. Dabei ist zu bedenken, dass zur optimalen Auswertung optimale Schnitte angefertigt werden müssen. Eventuelle Risse oder Falten in der zu vermessenden Region sind eine allerdings auch mit sorgfältigster Arbeitsweise nicht ganz auszuschließende Quelle für Messfehler. Diese sind für qualitative Auswertungen unerheblich, können allerdings bei quantitativen Bestimmungen von Bedeutung sein und müssen daher im Messablauf berücksichtigt werden. Durch Formalin entsteht eine Schrumpfung des Gewebes, Schneiden führt zu einer Stauchung, welche allerdings durch das nachfolgende Strecken wieder ausgeglichen wird. Bei zu starker Streckung entstehen wieder Risse, die den Messablauf beeinflussen. Die Verwendung unentkalkter Präparate gestattet die einfache und eindrucksvolle Anfärbung des Knochens mit Silbernitrat, was für die automatisierte Histomorphometrie eine ideale Ausgangsfärbung darstellt, da sie schnell und

einfach durchführbar ist und einen starken Kontrast erzeugt. Die ebenfalls verwendete Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ist die derzeit am besten geeignete zur Differenzierung der Strukturen im Knochen. Für eine stark automatisierte Anwendung reicht der Farbkontrast allerdings nur bedingt aus, der Fehlerbereich ist sehr groß. Die polychrome Sequenzmarkierung ist eine seit den 70er Jahren etablierte Methode zur Bestimmung des Knochenanbaus im Tierexperiment (370, 371). Für humane Anwendung bleibt nur eine mehrfache Anwendung von Tetrazyklin bzw. seinen Derivaten, wodurch allerdings die farbliche Distinguierung nicht gewährleistet ist. Im tierexperimentellen Bereich besteht jedoch die Möglichkeit verschieden farbige Fluorochrome zu verwenden und dadurch farblich sehr gut abgrenzbare Markierungen zu erhalten (370, 371, 375). Die intravenöse Applikation liefert dabei schmale, stark fluoreszierende Banden. Ist die Schnittebene allerdings nicht nahezu orthogonal zur Markierung, treten Fehlerquellen durch den schrägen Anschnitt auf. Aus diesem Grunde und aufgrund der in Wirbelkörpern und Beckenkämmen blässeren Markierung wurde die Mineralappositionsrate nur im kortikalen Rippenknochen ermittelt.

#### **4.1.3 Histomorphometrie und Bildanalyse**

In den letzten Jahren wurden die histomorphometrischen Methoden, die auf Raster- und Gesichtsfeldzählungen beruhen (z.B. Merz-Grid), zunehmend durch digitale Messprogramme ersetzt bzw. ergänzt. Durch neuere Verfahren soll der extreme Arbeitsaufwand verringert werden. Die Quantifizierung von Knochenparametern ist dabei seit längerem üblich, die Methoden variieren stark von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe. Durch die Entwicklung von Computerprogrammen wird in den letzten Jahren versucht, die Vergleichbarkeit von Studien verschiedener Arbeitsgruppen zu verbessern, den Arbeitsaufwand zu verringern und somit auch die bisher eher als stichprobenartig durchgeführten Messungen in größeren Fallzahlen zu bestätigen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden erfordern einen unterschiedlichen Arbeitsaufwand - teils sehr gering und sogar für Routinemessungen geeignet wie bei der Messung mikrostruktureller Parameter wie Knochendichte und Trabekeldicke am Gesamtpräparat mit einem zeitlichen Aufwand von wenigen Minuten pro Präparat, teils immer noch einen erheblichen Aufwand wie bei der Bestimmung der Umbauparameter (Oberflächenanteile von aktiver und passiver Resorption und Formation), der jedoch verglichen mit früher verwendeten Methoden immer noch deutlich geringer ist. Ein systematischer Fehler in dieser Untersuchung ist bei der Bestimmung der Trabekeldicke am Wirbelkörper im Ge-

samtpräparat entstanden. Dadurch, dass die Ausrichtung der Trabekel sehr stark in kraniokaudaler Richtung gegeben ist, waren die Mittelwerte der vertikalen, horizontalen und vom Schwerpunkt ausgehenden Strecken, die intratrabekulär lagen, insgesamt zu hoch. Bei dieser starken Anisotropie hätte sicherlich eine Wichtung der einzelnen Werte erfolgen müssen, das Messprogramm gilt es hier noch zu optimieren. Bei der weniger stark gerichteten Anordnung der Trabekel im Beckenkamm wurden mit dieser Methode allerdings akzeptable Werte bestimmt. Dies zeigt die Schwierigkeit der universellen Anwendung eines Computerprogramms zur Erhebung von Knochenparametern.

Durch Automatisierung versucht man die Messvorgänge unabhängig von Untersucher und Präparat zu gestalten, was allerdings nur bedingt gelingen kann, da sich das Problem stellt, die Vielfältigkeit der Präparate mit allen Artefakten und ihrer unterschiedlichen Qualität zu berücksichtigen, ohne dass dabei wesentliche Informationen verloren gehen. So kann die automatisierte Messung immer nur ein Kompromiss sein, es sei denn der Messvorgang wird so komplex gestaltet, dass wiederum viele untersucherabhängige Variablen mit eingehen. Die Eindeutigkeit der von Kossa-Färbung, die bei der Herstellung der Präparate wenig Probleme bereitet, eignet sich dabei besonders für solche automatisierten Methoden. Möchte man allerdings genauere Informationen über die Vorgänge im Knochen erhalten, benötigt man andere Färbungen wie zum Beispiel Masson-Goldner. Obwohl dort auch klare Strukturen zu erkennen sind, ist es doch schwierig aufgrund der unterschiedlichen Anfärbung selbst nach gleichem Färbeprotokoll sogar in einem Färbedurchlauf, eine automatisierte Messung vorzunehmen. Auf zellulärer Ebene ist dann doch immer noch das menschliche Auge gefragt zu entscheiden, z.B. handelt es sich um ein Artefakt oder eine tatsächliche Howship'sche Lakune, sind das noch Osteoblasten oder schon Knochenbelegzellen (s. Abb. 2.2-8). Die polychrome Sequenzmarkierung unterliegt von der Applikation der Substanzen, über die nie exakt gleich dicken Schliffpräparate, die Überlagerung durch die vergleichsweise dicken Schliffe und die unterschiedliche Intensität der Markersubstanzen vielen verschiedenen eine Automatisierung beeinflussenden Faktoren. Aufgrund der Segmentierung der Banden nach Grauwerten und der dann ggf. manuellen Vervollständigung der einzelnen Ringe (s. Abb. 2.3-9, Abb. 2.3-10) waren mit diesem Verfahren nur ganz bzw. so gut wie ganz geschlossene kreisähnliche Strukturen zu vermessen. Dies stellt aber bei einer genügenden Anzahl an Präparaten bzw. einer genügenden Präparatgröße wie in dieser Untersuchung keinen Nachteil dar, kann allerdings bei wenigen oder kleinen Proben problematisch sein.



Die Vergleichbarkeit zweier Methoden wurde in dieser Studie anhand der Trabekeldicke und Knochendichte gezeigt. Selbst wenn die Parameter sich vom Betrag her unterscheiden, ergibt sich jeweils auf die Untersuchungsgruppen bezogen der gleiche statistische Unterschied. Die ermittelten Werte sind dabei mit Werten aus der Literatur vergleichbar (s. 4.2.1, 4.3.1, 4.3.2). Allerdings zeigen sich dort wie auch in dieser Untersuchung starke Schwankungen, was noch einmal die Notwendigkeit einer Vereinheitlichung nicht nur in der Benennung der Parameter bestätigt. Statische Knochenparameter lassen sich mit vergleichbaren Ergebnissen auf diese beiden hier vorgestellten Arten bestimmen, was auch zeigt, dass ein geübter Untersucher ebenso wenig die Ergebnisse beeinflusst wie ein Computer. Trotz Bestrebungen, die Histomorphometrie durch weniger invasive und vor allem weniger zeitaufwendige Methoden zu ersetzen, stellt sie immer noch den Goldstandard bei der Diagnostik metabolischer Knochenerkrankungen dar, da in der Regel quantitative Bestimmungen vonnöten sind, um die Veränderungen eindeutig zu beschreiben (345,346). Die auftretenden inter- und intra-untersucher Unterschiede gilt es für diese neuen Messvorgänge noch zu untersuchen. In der Literatur sind Werte von ca. 10-30 % je nach Messparameter beschrieben (347,348).

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Insgesamt wiesen die Ergebnisse dieser Untersuchung darauf hin, dass bereits nach einem kurzen Behandlungszeitraum von 26 Tagen mit rekombinantem speziesspezifischem Wachstumshormon Veränderungen intakter Knochen zu erkennen sind. Dabei ist einleuchtend, dass Untersuchungen an feineren Strukturen (Osteon, Zellen) bereits signifikante Differenzen aufweisen, während das gröbere Erscheinungsbild (Trabekeldicke, Knochenfläche) zu einem so frühen Zeitpunkt noch unverändert ist. Knochenveränderungen werden in der Literatur hauptsächlich anhand von Spongiosaveränderungen beschrieben, was wohl am Standardbiopat aus dem Beckenkamm mit seiner nur geringen kortikalen Oberfläche liegen mag, treten aber ebenso in kortikalem Knochen auf (86). Es ist beschrieben, dass Rippenknochen sensibler auf diätäre oder hormonelle Veränderungen reagieren, als andere kortikale Knochen (349).

### **4.2.1 Knochenmikrostruktur**

Obwohl die Tiergruppen sich bezüglich Alter und Gewicht nicht unterschieden, zeigten sich größere Gesamtflächen bei den Wachstumshormontieren an den Wirbelkörperprä-

paraten bei geringerer Knochendichte. Dies lässt sich durch den verstärkt stattfindenden subperiostalen Knochenanbau am Wirbel erklären, welcher in dieser Untersuchung nur qualitativ und nicht quantitativ dargestellt wurde. Durch Tetrazyklinmarkierung konnte an normalen Ratten gezeigt werden, dass GH die subperiostale Knochenbildung induziert, ohne die endostale Oberfläche zu beeinflussen (300,301,327).

Auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen die dabei fehlenden Unterschiede zwischen Höhe und Tiefe der Wirbelkörper, was sich aber dadurch erklären lässt, dass jeweils nur die maximale Höhe und Tiefe gemessen wurde, der subperiostale Anbau aber bevorzugt ventral an der Wirbelkörpermetaphyse stattfand, die naturgemäß schlanker ist als die Epiphysen. Deshalb wirkte sich der verstärkte Anbau auf diese Parameter nicht aus. Sollte man den Anbau auf diese Weise bestimmen wollen, müsste als Parameter ein Mittelwert verschiedener Streckenmessungen gewählt werden bzw. auch die minimale Höhe und Tiefe der Präparate. Die hier erhobenen Werte von mittleren Wirbelkörperhöhen (28,22 mm) und –tiefen (14,05 mm) der Placebotiere sind vergleichbar mit Messungen am Makropräparat von Wirbelkörpern von Minischweinen, welche Werte von 32,3 mm bzw. 15,77 mm ergaben (106). Ein hauptsächlich subperiostal stattfindender Knochenanbau als Reaktion auf verschiedene Wachstumsreize ist in der Literatur beschrieben und auch in dieser Studie qualitativ in der Wachstumshormongruppe beobachtet worden (43,44,59,292,300,301,322,327). Der ventrale Anbau am Wirbelkörper bei ausbleibendem dorsalen Anbau ist einleuchtend, da ansonsten eine Einengung des Spinalkanals drohen würde. Auch den an den Beckenkämmen auftretenden höheren kortikalen Knochenanteil bei den GH-Tieren kann man hauptsächlich einem verstärkten subperiostalen Anbau zuschreiben, was in dieser Studie lediglich qualitativ beurteilt wurde.

Dass die Knochen der Placebotiere insgesamt einen höheren Anteil kalzifizierten Knochengewebes aufweisen, beruht hauptsächlich auf höheren kortikalen Werten, welche sich dadurch erklären lassen, dass Wachstumshormon einen verstärkten Knochenumbau bewirkt. Dieser drückt sich zunächst in verstärkter Resorption aus, die zu einer höheren kortikalen Porosität führt, welche in dieser Untersuchung an allen 3 Lokalisationen (Rippen, Wirbel, Beckenkamm) nachweisbar bleibt, obwohl durch die polychrome Sequenzmarkierung schon eine verstärkte Neubildung an der Kortikalis der Rippen zu zeigen ist. Der Apposition von neuem Knochen geht im gesunden Gewebe stets die Resorption voraus, was auch in dieser Studie zu sehen ist. Die Rippen der Placebotiere zeichnen sich durch einen höheren Gesamtknochenanteil aus, der auf dem höheren

kortikalen Knochenanteil beruht, ohne dass dabei Unterschiede in Kortikalisdicke oder Gesamtfläche bestehen, was aufgrund der kurzen Behandlungsdauer nicht verwundert. Auch hier erhöhte sich also die kortikale Porosität durch Wachstumshormongabe.

Trabekulär zeigten nur die Wirbelkörper der Kontrollgruppentiere höhere Werte als die der mit Wachstumshormon behandelten Tiere sowohl beim Knochenanteil als auch bei der Trabekeldicke mit beiden Messverfahren. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass an den Beckenkämmen der Umbauvorgang weiter vorangeschritten ist als an den Wirbelkörpern, wodurch der initial verstärkte Knochenabbau durch den nun ebenfalls verstärkten Anbau ausgeglichen wurde, an den Wirbelkörpern der hormonbehandelten Tiere die Resorption aber noch überwiegt. Es ist bekannt, dass verschiedene Knochen unterschiedlich schnell auf hormonelle Veränderungen reagieren (349). Eine aufschlussreiche Studie bezogen auf die ortsabhängigen Unterschiede des Umbaus von Beckenkamm versus Wirbel ist allerdings nicht bekannt.

#### **4.2.2 Remodellierungsparameter**

Eine insgesamt höhere Umbauaktivität zeigte sich bei den GH-Tieren sowohl in der Resorption als auch in der Formation, was sich reziprok auch durch den geringeren Anteil ruhenden Umfangs zeigt. Die ca. 20 % der Knochenoberfläche, die sich nach Angaben von Eriksen et al. ständig im Umbau befinden, konnten in dieser Größenordnung auch an den Wirbelkörper- und Beckenkammpräparaten der nichtbehandelten Tiere dieser Studie nachgewiesen werden (86). Die Unterschiede der Umbauparameter sind sowohl im resorptiven wie auch im formativen Bereich anhand der zellulären Oberflächenanteile, d.h. der mit Osteoklasten oder Osteoblasten bedeckten Trabekeloberflächen, eindeutiger darstellbar als durch die Messung der osteoidbedeckten bzw. mit leeren Howship'schen Lakunen bedeckten Oberflächen.

Hier zeigte sich an den Wirbelkörpern verglichen mit den Iliakalbiopsien mehr ruhende Oberfläche, was hauptsächlich der stärkeren Formation der Beckenkämme und dabei besonders dem aktiven osteoblastären Anteil zuzuschreiben ist, bei jedoch stärkerer aktiver Resorption an den Wirbelkörpern. Dies bestärkt die bereits unter 4.2.1 aufgestellte Vermutung, dass die Momentaufnahme der Remodellierung am Beckenkamm einen im Verlauf späteren Zeitpunkt zeigt als am Wirbelkörper, man also schon mehr Formation iliakal und noch mehr Resorption vertebral findet, wobei die Ursache möglicherweise in einer langsameren Aktivierung am Wirbelkörper liegt. Dies könnte dazu führen, dass bei gleicher Dauer der einzelnen Umbauphasen der Beckenkamm eines

Tieres dennoch schon weiter fortgeschritten im wachstumshormonbedingten Umbau ist als der Wirbelkörper desselben Versuchstiers. Angaben über unterschiedliche Aktivierungszeiträume sind der Literatur nicht zu entnehmen. Es wird also deutlich, wie stark die Ergebnisse nicht nur von der Messmethode sondern auch von dem gewählten Untersuchungsort abhängen und insbesondere auch, dass die statische Histomorphometrie stets nur eine Momentaufnahme ist, die eine gesteigerte Resorption, Formation oder einen gerade scheinbar unveränderten Zustand darstellen kann.

#### **4.2.3 Mineralappositionsrate**

Auch mit dieser Untersuchungsmethode ließ sich zeigen, dass der Knochenumbau bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren stärker war als bei den Kontrolltieren.

Da alle Tiere dieser Studie die gleichen Operations- und Nachbehandlungsbedingungen durchliefen und die Standzeit stets die gleiche war, lassen sich nur an den erhobenen dynamischen Knochenparametern Unterschiede zwischen Distraktions- und Konsolidierungsphase nachweisen, wobei nicht zu sagen ist, ob diese auf die Distraktion zurückzuführen sind oder auf das erlittene Trauma durch die Operation. Nachweisbar ist jedoch, dass die Mineralappositionsrate während der Distraktionszeit sowohl bei den hormonbehandelten als auch bei den placebobehandelten Tieren signifikant höher war als während der Konsolidierungsphase. Diese Aussage unterstützt verschiedene bisher durchgeführte Untersuchungen, welche den systemischen Einfluss lokaler Skelettverletzungen untersuchten (113,114,116,122,123,134,135,139). Die Ursachen dafür werden größtenteils in der Freisetzung lokaler Wachstumsfaktoren gesehen, und zu einem geringeren Anteil auch durch hormonelle Veränderungen verursacht, welche im Rahmen der knöchernen Verletzung und der konsekutiven Heilung auftreten (114,124,120). Die Verletzung des Knochenmarks gilt als Auslöser dieses Geschehens (115). Eine spezielle Beeinträchtigung des Knochenmarks stellt die Distraktionsosteogenese dar, weshalb einleuchtend ist, dass ihr Effekt auf den systemischen Knochenumbau von anderen Verletzungen verschieden ist (365). Dadurch kann allerdings nicht mehr davon ausgegangen werden, dass die Werte der Placebotiere als Werte einer gesunden Kontrollgruppe dienen können, welche nun in dieser Studie nicht zur Verfügung steht. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Untersuchung der Wachstumshormonwirkung, da die Gabe von GH in der vorliegenden Untersuchung der einzige messbare Unterschied zwischen den Gruppen ist.

### 4.3 Vergleich mit anderen Studien

Die bisher durchgeführten Studien zur Wachstumshormonwirkung unterscheiden sich von dieser Untersuchung bereits dadurch, dass hier arteigenes Hormon verwendet werden konnte und nicht wie sonst artfremdes. Zumeist wurden auch kleine Versuchstiere verwendet, was einen Vergleich sehr schwierig macht, insbesondere da Ratten zu den Tieren zählen, die keinen dem Menschen und anderen Tieren vergleichbaren Knochenumbau haben (110). Über die unterschiedlichen Messmethoden zur Erfassung von Knochenparametern und die daraus resultierende Vergleichbarkeit wurde bereits diskutiert (s. 4.1.3). Ziel aller bisher durchgeführten Untersuchungen mit Applikation von Wachstumshormon am Klein- oder Großtiermodell ist letztendlich die Anwendung am Menschen. Untersuchungen haben die Beschleunigung der Frakturheilung, der Knorpeldefektheilung, der Einheilung von Hauttransplantaten bei Menschen bzw. an Modellen mit normaler körpereigener Hormonsekretion gezeigt (223,229,230,232,234,236, 238-241,243,245,246,248-251,253,259-263,265,267,293, 301-303,328). Die vorgelegte Untersuchung zeigt, dass bereits nach einem 26tägigen Behandlungszeitraum mit Wachstumshormon eine systemische Wirkung am Knochengewebe nachweisbar ist. Bei längerer Gabe kann daraus letztlich iatrogen das Krankheitsbild der Akromegalie entstehen. Trotz allgemein günstiger Ergebnisse, sollte man daher die Indikationen einer Therapie mit Wachstumshormon genau prüfen.

#### 4.3.1 Tierexperimentelle Studien

Die Schwierigkeit der Extrapolation von Ergebnissen von Kleintierexperimenten auf den Menschen ist hinlänglich bekannt. Auch bei der Auswahl eines Großtiermodells muss hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit dem Menschen vieles bedacht werden. Gerade wenn Untersuchungen hormoneller Einflüsse anstehen, stellt das Schwein aufgrund seiner großen Ähnlichkeit mit dem Menschen ein geeignetes Modell dar. Auch der ebenfalls tagaktive Biorhythmus ist von Vorteil (109,110). Seit der Verfügbarkeit von Minischweinen finden diese gerade bei Untersuchungen der Knochenbiologie häufiger Verwendung als die vorher diesbezüglich hauptsächlich untersuchten Hunde und Schafe (109,110,350). Um ausschließlich die GH-Wirkung zu messen, ist es nicht sinnvoll, Untersuchungen an hypophysektomierten Tieren vorzunehmen, wie es früher zum Teil gemacht wurde, da dadurch weitere Veränderungen im Hormonhaushalt die Ergebnisse beeinflussen (298,322-324). An wachstumshormondefizienten Tieren, deren übrige Hypophysenhormone im Normbereich lagen, bewirkte die Gabe von GH eine

Erhöhung der Knochenmasse und Knochenbildung (325-327). In Kleintierexperimenten zur Wirkung von GH bei normalem endogenem Hormonhaushalt wurden meist Ratten verwendet, bei denen die Epiphysenfugen erst in einem sehr hohen Alter verschlossen sind, so dass ein lineares Knochenwachstum die Ergebnisse beeinflusste (301,328). Dieser Nachteil besteht zum Teil auch beim Schwein, insbesondere natürlich, wenn junge Tiere verwendet werden. Das Problem der offenen Epiphysenfugen am Wirbelkörper, wie in dieser Studie aufgetreten, wurde auch in anderen Studien erkannt, welche dennoch das Schwein als sehr gutes Modell für Untersuchungen an Wirbelsäulen beschreiben (106). In der Literatur finden sich bisher wenig Angaben zur Knochenstruktur des Schweins und dabei insbesondere des Minischweins. Untersuchungen zum Zeitpunkt des Epiphysenfugenschlusses sind nicht bekannt. In einer Vergleichsstudie zwischen mehreren Tiermodellen wurde am mazerierten Gesamtpräparat die Wirbelkörperhöhe und -tiefe bestimmt (106). Der vierte Lendenwirbel wurde gewählt als ein mechanisch vergleichbares Element zwischen Mensch und Vierbeiner. Die Werte der vorliegenden Studie waren in anteroposteriorer Ansicht ca. 1 mm kleiner, in kranio-kaudaler Richtung ca. 4 mm größer. McLain et al. machten keine Angaben über Alter, Gewicht und Rasse der lediglich 5 Minischweine dieser Studie (106). Vierbeiner haben im allgemeinen aufgrund der horizontalen Orientierung der Wirbelsäule schmalere Bandscheiben, eine verminderte lumbale Lordose und im Vergleich zum Menschen einen kleineren anteroposterioren Durchmesser des Wirbelkörpers. Das Schwein verfügt über dem Menschen ähnliche kortikale und trabekuläre Remodellierungsprozesse (104,108,109). Als echte Allesfresser sind sie auch das beste Modell für die humane gastrointestinale Funktion (105). Dies und der ähnliche Zyklus sind wichtig für Untersuchungen der Knochenbiologie. Das Minischwein ist ein anerkanntes Modell für Untersuchungen des Knochenmetabolismus (350). Knochenmasse und trabekuläre Dichte sind bei Schweinen als größer im Vergleich zum Menschen beschrieben (104,110). Iliakale Knochenbiopsien an Minischweinen haben eine trabekuläre Knochendichte von  $26,4 \pm 3,1$  % ergeben, einen Trabekeldurchmesser von  $108,0 \pm 22,4$   $\mu\text{m}$  und eine MAR von  $1,84 \pm 0,11$   $\mu\text{m/d}$  (351). Die Studie erwähnt allerdings nicht welche Art von Minischwein verwendet wurde. Die trabekuläre Knochendichte beträgt in der vorliegenden Untersuchung am Beckenkamm 17,10 (15,79/18,52) % in der Gesamtschnittmessung bzw. 21,06 (19,77/24,27) % in der Gesichtsfeldmessung und ist damit wesentlich kleiner. Aus der Studie von Piert et al. (351) lässt sich allerdings nicht erkennen, ob ein kortikaler

Anteil der Beckenkammbiopsie mitbestimmt wurde, was den höheren prozentualen Knochenanteil erklären würde, denn der Gesamtknochenanteil wurde in der hier vorliegenden Studie iliakal auch mit 23,77 (20,20/25,86) % bestimmt. Der Trabekeldurchmesser am Beckenkamm der Tiere der vorliegenden Untersuchung war mittels Gesamtschnittmessung vermutlich aufgrund der geringeren Vergrößerung im Median 134,23 (125,37-135,87)  $\mu\text{m}$ , in der Gesichtsfeldmessung hingegen 108,12 (92,75/112,02)  $\mu\text{m}$ . Die Standardabweichung in der Gesamtschnittmessung entsprach mit 22,0 der o.g. Studie von Piert et al. (351), war bei der Gesichtsfeldmessung jedoch mit 13,05 signifikant geringer. Die Mineralappositionsrate wurde in der vorliegenden Studie an kortikalem Knochen bestimmt und betrug beim unbehandelten Tier in der Konsolidierungsphase, welche am ehesten dem normalen Knochenmetabolismus entsprechen sollte, 1,55 (1,38/1,58)  $\mu\text{m}/\text{d}$ . Damit liegt sie in der gleichen Größenordnung wie die Ergebnisse der Studie von Piert et al. (351). Insgesamt liegen hier also vergleichbare Ergebnisse für den nichtbehandelten Knochen des Minischweins vor. Die systemische Auswirkung der Distraction darf allerdings nicht außer acht gelassen werden. Untersuchungen am 4 Monate alten Sinclair Minischwein ergaben am vierten Lendenwirbelkörper ein Knochenvolumen von 28,8 %, was dem in der vorliegenden Untersuchung bestimmten Wert in der Gesamtmessung von 28,63 % (24,07/29,18) in der Placebogruppe entspricht und auch dem durch Gesichtsfeldmessung ermittelten Wert von 25,24 % (22,48/28,15) vergleichbar ist (104). Die von der Mosekilde et al. bestimmte Trabekeldicke von 110  $\mu\text{m}$  am Sinclair Minischwein ist mit der durch Gesichtsfeldmessung ermittelten Dicke von 104,09  $\mu\text{m}$  (97,38/109,42) auch sehr gut vergleichbar, die viel höheren Werte der Gesamtpräparatmessung am Wirbelkörper wurden bereits unter 4.1.3 diskutiert (104). Auch die Werte für die Resorption sind zwischen der vorliegenden und der von Mosekilde et al. durchgeführten Studie durchaus vergleichbar. Der prozentuale Anteil der aktiven Resorptionsoberfläche beträgt bei Mosekilde et al. 4,2 % und 5,05 % in der hier untersuchten Placebogruppe. Der Gesamtresorptionsanteil unterscheidet sich mit 11,1 % bei Mosekilde et al. und 12,26 % in der vorliegenden Untersuchung bei den Kontrolltieren ebenfalls nur wenig. Ob die in der vorliegenden Studie gering höheren Werte als Ursache die systemische Auswirkung der Distraction auf den Umbau haben, lässt sich nicht feststellen. Die Mineralappositionsrate, die in der vorliegenden Untersuchung mit 1,55  $\mu\text{m}/\text{d}$  bei den Placebotieren in der Konsolidierungsphase – wie oben bereits erwähnt am kortikalen Rippenknochen – ermittelt wurde, liegt bei Mosekilde et al. mit 1,47  $\mu\text{m}/\text{d}$  am Wirbelkörper in der gleichen

Größenordnung. Die Annahme, dass kortikaler Knochen insgesamt langsamer remodelliert als trabekulärer kann somit unter Berücksichtigung der kortikalen Werte der vorliegenden Studie im Vergleich mit den trabekulären Werten bei Piert et al. sowie Mosekilde et al. nicht bestätigt werden, eher hingegen dass Rippenknochen im Vergleich mit anderen Röhrenknochen einen stärkeren Umbau zeigen (351,104,349). Des weiteren bestätigen die unterschiedlichen Ergebnisse der zwei Lokalisationen Beckenkamm und Wirbelkörper auch in den anderen beiden Studien von Piert und Mosekilde die Aussage, dass Wirbelkörper zu den langsamer remodellierenden Knochen zählen. Mikroradiographische Untersuchungen an Schweinerippen mit Zahnimplantaten ergaben eine mittlere Knochendichte von  $50,6 \pm 6,6$  %, die sich allerdings sowohl aus kortikalem als auch aus trabekulärem Knochen zusammensetzte und nur eine Region um das Implantat herum bestimmte (352). Es ist daher anzunehmen, dass die höhere Gesamtknochendichte von 67,78 (64,85/70,07) % in der vorliegenden Studie dadurch erklärbar ist, dass eine Rippe einen insgesamt höheren kortikalen Knochenanteil hat (hier 68,68 %, bei Friberg et al. 58,89 %), der zu einer größeren Gesamtdichte beiträgt. Mit einer weiteren Methode wurden am Arcus zygomaticus von 12 jungen Schlachtschweinen Knochendichten von 38-51 % an unterschiedlichen Lokalisationen festgestellt, Trabekeldicken durch indirekte Bestimmung von 280 bis 380  $\mu\text{m}$  (353). Dies zeigt die unterschiedliche Mikroanatomie der einzelnen Knochen und die dadurch wieder erschwerte Vergleichbarkeit.

#### **4.3.2 Untersuchungen an humanen Präparaten**

Es ergeben sich bei Untersuchungen der Knochendichte am Menschen sehr verschiedene Werte. Dies beruht auch auf den unterschiedlichen verwendeten Knochen und den teilweise nicht genauen Angaben zur Messmethodik, so dass nicht immer eindeutig klar ist, ob rein trabekulärer Knochen gemessen wurde oder kortikale Anteile in die Messung mit eingeflossen sind. Außerdem findet sich ein Geschlechtsunterschied. Da der Mensch sehr alt wird verglichen mit den zumeist als Versuchstier verwendeten Spezies, ist erklärbar, dass die Untersuchungen zur Knochendichte meist an Präparaten älterer Menschen durchgeführt wurden. Wird das Minischwein als Tiermodell weitere Anwendung finden, so werden sich vermutlich auch hier alters- und geschlechtsabhängige Unterschiede der Knochenstruktur aufzeigen lassen.

Die Trabekeldicke wird beim Menschen an verschiedenen Knochen (Beckenkamm, Lendenwirbel, Tibia und Femur) im Mittel mit ca. 150  $\mu\text{m}$  angegeben, dabei schwanken



die Werte von 95  $\mu\text{m}$  bis 284  $\mu\text{m}$  (98,100,354-358). Somit liegen hier die gemessenen Werte des Yucatan-Minischweins in einer vergleichbaren Größenordnung. Die Aussage, die porcinen Trabekel seien plumper und dicker lässt sich also nicht bestätigen. Die Mineralappositionsrate (MAR) wurde beim Menschen in einer Untersuchung an verschiedenen Knochen mit im Schnitt 1,1  $\mu\text{m}/\text{d}$  bestimmt (336). Andere Studien beschreiben Werte von 0 bis 1,1  $\mu\text{m}/\text{d}$  (315,359,360). Die MAR beim Yucatan-Minischwein liegt also mit 1,55  $\mu\text{m}/\text{d}$  in der Kontrollgruppe während der Konsolidierungsphase höher. Ob der Einfluss der ossären Verletzung dazu beigetragen hat, oder ob beim Schwein ein höherer Knochenumsatz insgesamt vorliegt, lässt sich durch diese Untersuchung nicht ermitteln. Die Porosität des menschlichen Knochens beträgt nach Angaben aus der Literatur bei jungen Menschen ca. 5 % bei älteren ca. 2,5 % (98). In der vorliegenden Untersuchung wurde an den Rippen der Placebotiere eine Porosität von 7,47 (5,62/10,10) % gemessen. Auch dies sind vergleichbare Werte. Die Ursache für die verringerte Porosität im Alter ist vermutlich auf einen verminderten Abbau alten, spröderen Knochens zurückzuführen (77-79). Die in der Literatur hinsichtlich der Remodellierungsparameter zu findenden Angaben zeigen eine starke Heterogenität, was vermutlich zu einem großen Teil auf den verschiedenen Mess- bzw. Berechnungsmethoden beruht (98,315,354-356,359). Eine Vereinheitlichung zum besseren Vergleich sollte angestrebt werden. Zu jedem Zeitpunkt befinden sich laut Parfitt et al. ca. 20 % der Knochenoberfläche im Umbau (80). Mit den ermittelten 20,84 % am Wirbelkörper bzw. 24,02 % am Beckenkamm der Kontrollgruppentiere stimmen die Werte am Yucatan-Minischwein damit überein. Für die Knochendichte findet man in der Literatur Werte für humanen Knochen von zwischen ca. 7 bis ca. 30 % am Beckenkamm, wobei die Werte hauptsächlich bei knapp 20 % liegen (100,315,354,355,357,358,361-363). Dies ist mit den 17,10 (15,79/18,52) % in der Gesamtschnittmessung respektive 21,06 (19,77/24,27) % bei der Gesichtsfeldmessung an den Beckenkämmen der Placebotiere der vorliegenden Untersuchung am Yucatan-Minischwein vergleichbar. An verschiedenen Lendenwirbelkörpern wurden beim Menschen eine Knochendichte zwischen 5 und 16 % bestimmt (100,357,364). Wirbelkörper wurden allerdings wesentlich seltener untersucht als Iliakalbiopsien. Die Werte der vorliegenden Untersuchung liegen beim Yucatan-Minischwein mit 28,63 bzw. 25,24 % (Gesamtschnittmessung bzw. Gesichtsfeldmessung jeweils Kontrollgruppentiere) wesentlich höher, selbst die Werte für junge Menschen werden in der Literatur mit maximal 16 % am dritten Lendenwirbel angegeben (364). Weitere Knochendichtebestimmungen am Menschen ergaben am Femurkopf Werte

zwischen 25,1 und 32,4 %, am Femurschaft hingegen nur 11,05 % (98,354). Eine große Spannbreite der Werte ist hierbei zu erwarten und entspricht auch dem Wolff'schen Gesetz (74). Die Wirbelkörperhöhe des vierten humanen Lendenwirbels wird mit ca. 30 mm, die Wirbelkörpertiefe mit ca. 35 mm in der Literatur angegeben (106). Die Werte dieser Studie betragen in kraniokaudaler Richtung (Höhe) 28,22 mm (27,04/29,64) und in anteroposteriorer Richtung (Tiefe) 14,05 mm (13,17/14,80) bei den Placebotieren. Der große Unterschied insbesondere in der anteroposterioren Ausdehnung der humanen Lendenwirbelkörper verglichen mit allen ansonsten als Modell untersuchten Spezies liegt in der Zweibeinigkeit des Menschen begründet. Das heißt, die Aufgaben der Muskulatur sowie die Last auf den Wirbelkörper sind verschieden vom Vierbeiner. Durch den größeren Druck, der auf den Lendenwirbeln lastet, ergibt sich die biomechanisch sinnvolle größere Tiefe des menschlichen Wirbelkörpers. Dennoch ist verglichen mit anderen Großtieren das Yucatan-Minischwein als ein geeignetes Modell für Wirbelsäulenstudien beschrieben worden (106). Die bisher durchgeführten Studien einschließlich der vorliegenden zeigen also eine relative Ähnlichkeit der humanen und porcinen Knochenstruktur.

#### **4.3.3 Wirkung von GH auf Knochen**

Die meisten Studien zur Wirkung von systemischer Erhöhung des Wachstumshormonspiegels, sei es endogen oder exogen, weisen eine erhöhte kortikale Knochenmasse nach, der spongiöse Knochen scheint großteils unverändert zu bleiben (166,278,315,316,318,320,321). Mit verschiedenen Methoden wurden bei Akromegaliepatienten sowohl erniedrigte als auch erhöhte Werte der Knochendichte an der Lendenwirbelsäule gemessen (319,320). Hingegen ergaben histomorphometrische Untersuchungen an Beckenkammbiopsien von Patienten mit Akromegalie eine erhöhte Knochenmasse sowohl am kortikalen als auch am spongiösen Knochen (315). Eine andere ebenfalls an Patienten mit gesteigerter endogener Wachstumshormonsekretion durchgeführte Studie zeigte eine erhöhte kortikale Knochendichte am Femur, aber eine normale an der Lendenwirbelsäule (316). Der Vergleich von gesunden Menschen mit an Akromegalie erkrankten ergab eine gesteigerte MAR von 0,87  $\mu\text{m}/\text{d}$  bei den Akromegaliepatienten verglichen mit 0,6  $\mu\text{m}/\text{d}$  bei den Gesunden (315). Wachstumshormon beeinflusst also diese Knochenparameter beim Menschen, wie auch am Yucatan-Minischwein. Anhand der Studie von Halse et al. ist die Knochenresorption bei Akromegaliepatienten erhöht, die Knochenformation hingegen erniedrigt (315). Dies bestätigt

auch die hier vorgelegten Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Wachstumshormon auf den Knochenumbau. Die weniger eindrucksvollen Unterschiede resultieren in der kurzen Behandlungsdauer mit GH. Bei der endogenen Überproduktion in der o.g. Studie, bestand der erhöhte GH-Spiegel bei den Patienten weitaus länger (315). Auch bei Patienten mit Wachstumshormonmangel führte die systemische GH-Gabe zunächst zu einer gesteigerten Knochenresorption, allerdings bei insgesamt erhöhter Umbaurate wie auch bei Akromegalie, bei längerer Applikation jedoch durch die vermehrte Knochenbildung zu einer erhöhten Knochenmasse entsprechend dem „biphasischen Modell“ der GH-Wirkung (306,307). Nimmt man alle klinischen Studien an Patienten mit Wachstumshormonmangel zusammen, so scheint der Umkehrpunkt bei ca. 6 Monaten zu liegen, eine Nettozunahme der Knochenmasse ist dann aber erst nach 12-18 Monaten zu erwarten. Ob dies auch für Personen mit normaler GH-Sekretion gilt, ist noch zu untersuchen (308). In einer sehr kleinen Studie wurde an drei osteoporotischen Patienten histomorphometrisch eine erhöhte subperiostale Knochenbildung durch systemische exogene GH-Behandlung gezeigt (305). Dies korreliert mit den experimentellen Studien, allerdings müssen diese Effekte in größeren Studien bestätigt werden. Die systemische Wachstumshormonapplikation bewirkte in einer Studie am Rattenmodell keine messbaren Veränderungen des trabekulären Wirbelkörperknochens (328). Es konnten weder bei der Knochendichte noch beim Verhältnis von Oberfläche zu Volumen signifikante Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe festgestellt werden (328). Nicht untersucht wurden bei Andreassen et al. die Unterschiede des Knochenumbaus, bei denen die hier vorgelegten Ergebnisse wie oben beschrieben gerade signifikante Unterschiede am trabekulären Knochen zeigen, obwohl die Behandlungsdauer nur sehr kurz war. Aber auch die weniger eindeutigen Unterschiede bei der Messung der Knochendichte und Trabekeldicke zeigten in der vorliegenden Studie teilweise signifikante trabekuläre Veränderungen durch die kurzzeitige Applikation von Wachstumshormon. Die beschriebene besonders zu Beginn einer Therapie mit Wachstumshormon gesteigerte Resorption kann auch anhand der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden (308). Untersuchungen an Primaten haben eine Erhöhung der Knochendichte sowie der Knochenneubildung nach kurzzeitiger GH-Applikation gezeigt (330). Die Wirkung zeigte sich an kortikalen Knochen wie Tibia und Femur, an den vorwiegend spongiösen Wirbeln hingegen konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden, was wieder im Widerspruch zu der vorliegenden Untersuchung steht. Bei der GH-induzierten subperiostalen Knochenbildung wurden regionale Unter-

schiede beobachtet. So fand Knochenanbau an den Außenflächen lumbaler Wirbel statt, nicht jedoch im Bereich des Spinalkanals (328). Dies bestätigte sich auch in der hier vorgelegten Studie, wurde allerdings nur qualitativ beschrieben. GH verursachte die Bildung von Hohlräumen in der Kortikalis des Wirbelkörpers im Gegensatz zum diaphysären kortikalen Knochen (328,332). In der vorliegenden Untersuchung konnten keine Kortikalisunterbrechungen an den Wirbelkörpern bzw. Beckenkämmen nach sechsundzwanzigtägiger Behandlungsdauer gezeigt werden. Jedoch erhöhte die Wachstumshormonapplikation die Porosität der Kortikalis an den Rippenpräparaten.

#### **4.3.4 Wirkung von Distraction auf Knochen**

Anhand des beschriebenen Modells war es möglich, die einzelnen Effekte der Distraction und Konsolidierung auf die Mineralappositionsrate zu vergleichen. Durch die dreifache polychrome Sequenzmarkierung ließ sich die MAR im Distractionszeitraum und im Konsolidierungszeitraum jeweils an denselben Tieren messen. Bei den statischen Parametern war dies nicht möglich. Dennoch geben die hier ermittelten Werte Anlass zu der Annahme, dass in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen der mechanische Reiz der Kallusdistraction über die Freisetzung verschiedener Mediatoren zu einem systemischen Akzelerationsphänomen führt, welches nach Abklingen dieses mechanischen Reizes zügig wieder verschwindet (115). Bei einem Vergleich der Serien von Patienten mit Distractionsosteogenese und Patienten mit rigide stabilisierter Tibiakopfosteotomie zeigte sich, dass durch Kallotaxis im Gegensatz zur Osteotomie die proliferative Aktivität erhöht wurde (365). Zusätzlich wurde nur bei der Distraction ein signifikanter Anstieg von aktivem TGF- $\beta$  verzeichnet. Man kann daher annehmen, dass der systemische Effekt bei der Distraction aufgrund der mechanischen Stimulation entsteht. TGF- $\beta$  ist dabei einer der Mediatoren dieses Effekts, dessen Freisetzung möglicherweise durch die mechanische Belastung reguliert wird (116,144). Zyklische Dehnung von Zellkulturen stimuliert deren Proliferation und erhöht die Produktion von TGF- $\beta$  (143). Über die nachhaltige Dauer des Phänomens ist bisher keine Untersuchung durchgeführt worden. Die Dauer der systemischen Wirkung einer lokalen Verletzung bei der Ratte von 19 Tagen entspricht dem Zeitrahmen der frühen Frakturheilung (114,125,126). Es ist allerdings zu vermuten, dass der beschleunigte Knochenstoffwechsel die Stimulierung nicht lange überdauert, da die meisten mitverantwortlichen Wachstumsfaktoren nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzen und wie bei Holbein et al. beschrieben nur der aktive Faktor für die Wirkung verantwortlich ist, nicht

jedoch der gebundene (365). Einhorn beschreibt eine Dauer des anabolen Effekts durch Skelettverletzung von ca. 30 Tagen bei Ratten, aber in der Studie findet eine einmalige Verletzung statt und nicht wie in dem hier beschriebenen Modell eine dreizehntägige Distraktionsphase (114). Die vorliegende Studie zeigt einen Unterschied zwischen der MAR der Distraktionsphase und der sich direkt anschließenden Konsolidierungsphase bei einer insgesamt kurzen Versuchsdauer, so dass hier ein Hinweis für die Kürze der systemischen Wirkung der Kallusdistraktion auf den Knochenmetabolismus gegeben wird. Im Gegensatz zu anderen Studien, die das Akzelerationsphänomen in der Regel an den langen Röhrenknochen der gewichtsbelasteten unteren bzw. bei Vierbeinern hinteren und vorderen Extremitäten untersucht haben, zeigte sich in dieser Studie der Effekt auch an den nicht lasttragenden Rippen. Das Vorkommen anaboler Effekte am Skelett nach entfernter lokaler Skelettverletzung ist am Rattenmodell durch Beschädigung oder Entfernung des Knochenmarks etabliert (113-116). Eine ähnliche Studie am Hund konnte diesen Effekt nicht darstellen, allerdings war dort die Verletzung des Knochenmarks nur sehr gering (366). Auch die lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus einem Implantat steigert das Einwachsen eines Implantates auf der kontralateralen Seite (367). Altern, welches möglicherweise den beschriebenen Effekt verfälschen könnte, hat nach Einhorn in dem Falle keinen Effekt auf die MAR, was wiederum nur an Ratten untersucht wurde, die sich in der Regel während einer Studie noch im Wachstum befinden. Man kann davon ausgehen, dass am adulten Minischwein das Altern während der kurzen Versuchsphase von 26 Tagen keinen beeinflussenden Effekt auf die MAR hat. Viele Studien verwenden bei Untersuchungen von Knochenveränderungen als Kontrolle die nicht behandelte Gegenseite. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung sowie auch der vorangehend genannten sollten dabei stets die systemischen Auswirkungen einer lokalisierten Skelettverletzung und die mögliche Beeinflussung der Ergebnisse beachtet werden. Die Untersuchung des unterschiedlichen Ausmaßes des Einflusses von verschiedenen Verletzungsarten auf den Knochenumbau bleibt weiteren Studien vorbehalten. Ebenso kann die Dehnung von Muskel- und Nervengewebe, von Haut und Gefäßen einen Einfluss auf die systemische Wirkung haben (134).

#### 4.4 Schlussfolgerung

Die Wirkung des Wachstumshormons auf den Knochenumbau und die Knochenstruktur konnte mit verschiedenen quantitativen Methoden an den gewählten Knochenbiopsien des Yucatan-Minischweins nachgewiesen werden. In Zusammenschau aller Ergebnisse dieser Studie kann angenommen werden, dass rekombinantes, speziesspezifisches Wachstumshormon eine aktivierende Wirkung auf die Knochenremodellierung hat. Dabei zeigen die kleineren Strukturen wie zelluläre Oberflächenbestandteile und Osteone die Veränderungen nach kurzer Behandlungsdauer eindeutiger auf als die gröberen Strukturen wie Knochendichte und Trabekeldicke. Dies muss bei der Auswahl der Messmethoden für das jeweilige Versuchsdesign bedacht werden.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass verschiedene Knochen unterschiedlich bzw. mit unterschiedlicher Geschwindigkeit auf die gleichen Reize reagieren. Zur Bestätigung dieser These sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die kortikale Mineralappositionsrate ist zusammen mit einer polychromen Fluoreszenzmarkierung geeignet, Unterschiede nicht nur zwischen den Gruppen sondern auch zwischen der Distraktionsphase und der Konsolidierungsphase darzustellen bzw. auch andere im zeitlichen Verlauf veränderbare auf den Knochen wirkende Einflüsse.

Distraktionsosteogenese hat eine systemische stimulierende Auswirkung auf den Knochenumbau. Daher sollten vermeintlich gesunde Gegenseiten bei Knochenuntersuchungen, bei denen einseitig eine Skelettverletzung vorliegt, nur bedingt zum Vergleich eingesetzt werden.

Die hier angewendeten quantitativen histologischen Methoden liefern mit in der Literatur angegebenen Messungen vergleichbare Werte. Eine Vereinheitlichung der Methoden zusammen mit einer Minimierung des Arbeitsaufwands sollten die Ziele der international knochenhistologisch arbeitenden Gruppen sein, um so eine bessere Vergleichbarkeit der vorhandenen Daten zu ermöglichen.

Die in dieser Studie quantifizierten histologischen Entitäten am Yucatan-Minischwein stimmen näherungsweise mit Angaben aus der Literatur zu porcinem Knochen überein und sind mit Werten des menschlichen Knochens vergleichbar, so dass aufgrund der Ähnlichkeiten der Spezies Mensch und Schwein bezüglich knöcherner Strukturen und Umbauparameter das Schwein weiterhin als geeignetes Tier für Experimente hinsichtlich ossärer Veränderungen zu akzeptieren ist.

## 5 Zusammenfassung

Die Auswirkung der systemischen Applikation von täglich 100µg/kg/KG rekombinantem speziesspezifischem Wachstumshormon über 26 Tage auf den Knochenumbau des Yucatan-Minischweins wurde an Wirbelkörpern, Beckenkämmen und Rippen untersucht. Die erhobenen Knochenparameter des Yucatan-Minischweins wurden mit Angaben aus der Literatur von anderen Wirbeltieren inklusive Menschen verglichen. Der Einfluss der Distraktionsosteogenese auf die Mineralappositionsrate wurde am Yucatan-Minischwein untersucht.

24 weibliche geschlechtsreife Yucatan-Minischweine erhielten eine Osteotomie und Fixateur externe Anlage an der linken Tibia. Es erfolgte nach einer viertägigen Latenzphase eine zehntägige Distraktionsphase mit 2x1 mm/d gefolgt von einer zehntägigen Konsolidierungsphase. Die Hälfte der Tiere erhielt die o.g. Dosis Wachstumshormon, die andere sterile Kochsalzlösung als Placebo, subkutan appliziert. Zur polychromen Fluoreszenzmarkierung erhielten alle Tiere Calcein, Tetrazyklin und Xylenol an Tag 3, 16 und 23 respektive. *Post mortem* wurden die o.g. Knochen histologisch aufgearbeitet und in Kunststoff auf Methylmetacrylatbasis eingebettet. Es wurden Schnitte und Dünnschliffe angefertigt. Die Schnitte wurden nach Masson-Goldner und von Kossa gefärbt. Mittels Bildanalysesystem und eigens angefertigter Makros erfolgte die histomorphometrische Auswertung anhand der Parameter Knochendichte, Porosität, Trabekeldicke, Trabekelumbauparameter (Osteoklasten, Howship'sche Lakunen, Osteoblasten, Osteoid) und Mineralappositionsrate.

Signifikante Veränderungen durch Wachstumshormongabe zeigten sich bei vielen jedoch nicht bei allen bestimmten Parametern. Unterschiede zwischen den Lokalisationen traten auf. So war die Knochendichte der hormonbehandelten Tiere an den Wirbelkörpern und Rippen signifikant geringer als bei der Placebogruppe, kein signifikanter Unterschied zeigte sich an den Beckenkammpräparaten. An allen drei Lokalisationen war in der Wachstumshormongruppe eine signifikant geringere kortikale Knochendichte ermittelt worden als in der Placebogruppe, dementsprechend war die kortikale Porosität bei den hormonbehandelten Tieren lokalisationsunabhängig signifikant erhöht. Nur am Wirbelkörper war die trabekuläre Knochendichte bei der Gesamtschnittmessung bei den GH-Tieren signifikant geringer als bei den Kontrolltieren. Ansonsten zeigten sich bei der trabekulären Knochendichte keine signifikanten Unterschiede. Dementsprechend war

die Trabekeldicke auch bei den Wirbelkörpern der hormonbehandelten Tiere signifikant geringer, nicht jedoch an den Beckenkämmen.

Die Knochenresorption gemessen anhand o.g. Umfangsparameter war in der GH-Gruppe am Beckenkamm signifikant erhöht, unterschied man zwischen aktiver und passiver Resorption, so war die aktive Resorption bei den hormonbehandelten Tieren sowohl am Beckenkamm als auch am Wirbel signifikant erhöht, die passive nur am Beckenkamm. Die Formation war bei den GH-Tieren sowohl iliakal als auch vertebral signifikant erhöht, wobei hier die Unterschiede nach Differenzierung in aktiv und passiv weniger deutlich zutage traten. Insgesamt ergab sich damit auch ein signifikant verminderter Anteil an ruhender Oberfläche bei den Wachstumshormontieren sowohl am Beckenkamm als auch am Wirbelkörper. In ihrer Ausprägung waren diese Parameter zwischen Wirbel und Beckenkamm signifikant verschieden. Den Einfluss der Messmethode bei der Histomorphometrie zeigte die Untersuchung gleicher Parameter mit 2 verschiedenen Methoden.

Die kortikale Mineralappositionsrate (MAR) war in der GH-Gruppe signifikant höher als in der Placebogruppe, außerdem war sie während der Distraktionsphase signifikant höher als während der Konsolidierungsphase. Eine neue für die vorliegende Studie entwickelte wenig zeitaufwendige und anwenderfreundliche Methode wurde zur Messung der MAR verwendet.

Vergleicht man die erhobenen Parameter mit Angaben aus der Literatur, so kann bestätigt werden, dass die hier verwendeten Messmethoden zur Bestimmung der gewünschten Parameter geeignet sind, und dass das Yucatan-Minischwein ein geeignetes Modell zur Klärung von Fragestellungen der Knochenbiologie auch im Hinblick auf den Vergleich zum Menschen darstellt.

Die vorliegende Studie zeigt den Einfluss des Wachstumshormons auf verschiedene Parameter des Knochenumbaus an verschiedenen Knochenproben und die Beschleunigung der Mineralappositionsrate an kortikalem Rippenknochen durch Distraktionsosteogenese an der Tibia des gleichen Tieres.



## Literatur

1. Glorieux F 1982 Hormonal control of mineral homeostasis. In: Cruess R (ed.) The musculoskeletal System. Embryology, Biochemistry, and Physiology. Churchill Livingstone, New York, pp 171-190.
2. Glimcher M 1981 On the form and function of bone: From molecules to organs. Wolff's law revisited. In: Veis A (ed.) The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues. Elsevier North Holland, New York, pp 617-675.
3. Beresford JN 1989 Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. Clin Orthop Rel Res **240**:270-280.
4. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK 1995 Osteoblast and chondroblast differentiation. Bone **17**(Suppl 2):S77-S83.
5. Escarot-Charrier B, Glorieux F, Rest Mvd, al e 1983 Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. J Cell Biol **96**:639-643.
6. Hohling HJ, Barckhaus RH, Krefting ER, Quint P, Althoff J 1978 Quantitative electron microscopy of the early stages of cartilage mineralization. Metab Bone Dis Relat Res **1**:109-114.
7. Landis W, Song M, Leith A, McEwen L, McEwen B 1993 Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. J Struct Biol **110**:39-54.
8. Owen M 1978 Histogenesis of bone cells. Calcif Tis Res **25**:205-207.
9. Parfitt A 1977 The cellular basis of bone turnover and bone loss. Clin Orthop Rel Res **127**:236-247.
10. Doty S 1981 Morphological evidence of gap junctions between bone cells. Calcif Tissue Int **33**:509-512.
11. Cowin SC, Moss- Salentijn L, Moss ML 1991 Candidates for the mechanosensory system in bone. J Biomed Eng **113**:191-197.
12. Aarden EM, Wassenaar AM, Nijweide PJ 1994 Extracellular matrix protein synthesis by osteocytes. J Bone Miner Res **9**(Suppl 1):S168.
13. Marks S 1983 The origin of osteoclasts: Evidence, clinical implications and investigative challenges of an extraskeletal source. J Oral Pathol **12**:226-256.
14. Addison W 1978 Enzyme histochemical properties of kitten osteoclasts in bone imprint preparations. Histochem J **10**:645-656.
15. Watanabe H, Yanagisawa T, Sasaki J 1995 Cytoskeletal architecture of rat calvarial osteoclasts: Microfilament, intermediate filaments, and nuclear matrix as demonstrated by detergent perfusion. Anat Rec **243**:165-174.
16. Osdoby P, Martini M, Caplan A 1982 Isolated osteoclasts and their presumed progenitor cells, the monocyte, in culture. J Exp Zool **224**:331-344.
17. Suda T, Takahashi N, Martin T 1995 Modulation of Osteoclast Differentiation: Update 1995. Endocrin Rev **4**:266-270.
18. Prallet B, Male P, Neff L, Baron R 1992 Identification of a functional mononuclear precursor of the osteoclast in chicken medullary bone marrow cultures. J Bone Miner Res **7**:405-414.
19. Martin T, Ng K 1994 Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. J Cell Biochem **56**:357-366.
20. Rodan G, Martin T 1981 Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: A hypothesis.

- Calcif Tissue Int **33**:349-351.
21. McSheehy P, Chambers T 1986 Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* **119**:1654-1659.
  22. Jones S, Boyde A 1976 Experimental study of changes in osteoblastic shape induced by calcitonin and parathyroid extract in an organ culture system. *Cell Tissue Res* **169**:449-465.
  23. Kanehisa J, Heersche J 1988 Osteoclastic bone resorption: In vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts. *Bone* **9**:73-79.
  24. Posner A 1969 Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev* **49**:760-792.
  25. Watson M, Robinson R 1953 Collagen-crystal relationships in bone. II. Electron microscope study of basic calcium phosphate crystals. *Am J Anat* **93**:25-60.
  26. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA 1979 The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med* **311**:13-23.
  27. Sandberg MM 1991 Matrix in cartilage and bone development: current views on the function and regulation of major organic components. *Ann Med* **23**:207-217.
  28. Termine J, Kleinmann H, Whitson S, al e 1981 Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**:99-105.
  29. Butler W 1989 The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* **23**:123-136.
  30. Reinholt F, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D 1990 Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts in bone. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4473-4475.
  31. Boskey A, Maresca M, Ullrich W, Doty S, Butler W, Prince C 1993 Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* **22**:147-159.
  32. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG 1991 Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* **49**(6):421-426.
  33. Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zamboni G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas P, Zallone A 1994 Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix gla proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* **127**:1149-1158.
  34. Romberg R, Werness P, Riggs B, Mann K 1986 Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* **25**:1176-1180.
  35. Ritter N, Farach-Carson M, Butler W 1992 Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin. *Bone Miner Res* **7**:877-885.
  36. Price P, Parthemore J, Deftos L 1980 New biochemical marker for bone metabolism: Measurement by radioimmunoassay of bone Gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* **66**:878-883.
  37. Menanteau J, Neumann W, Neumann M 1982 A study of bone proteins which can prevent hydroxyapatite formation. *Metab Bone Dis Relat Res* **4**:157-162.
  38. Boskey A 1981 Current concepts of the biochemistry and physiology of calcification. *Clin Orthop* **157**:165-196.
  39. Wuthier R 1982 A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of cells, mitochondria and matrix vesicles. *Clin Orthop* **169**:219-242.
  40. Robey P, Boskey A 1995 The biochemistry of bone. In: Markus R, Feldman D, Bilizekian J, Kelsey J (eds.) *Osteoporosis*. Academic Press, New York, pp 95-183.
  41. Vidal Bdc 1979 The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell Mol Biol* **26**:415-421.
  42. Bolander ME 1992 Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*

- 200(2):165-70.**
43. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S 1993 Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* **8 Suppl 2**:S565-72.
  44. Trippel SB 1997 Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect* **46**:473-6.
  45. Solheim E 1998 Growth factors in bone. *Int Orthopaedics* **22**:410-416.
  46. Baird A, Walicke PA 1989 Fibroblast growth factors. *Br Med Bull* **45(2)**:438-52.
  47. Gospodarowicz D 1990 Fibroblast growth factor: chemical structure and biological function. *Clin Orthop* **257**:231-248.
  48. Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, Poser JW 1998 Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop* (355 Suppl):S283-93.
  49. Jingushi S, Heydemann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME 1990 Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* **8(3)**:364-71.
  50. Andreshak JL, Rabin SI, Patwardhan AG, Wezeman FH 1997 Tibial segmental defect repair: chondrogenesis and biomechanical strength modulated by basic fibroblast growth factor. *Anat Rec* **248(2)**:198-204.
  51. Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, Nigi H 1998 Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res* **13(6)**:942-9.
  52. Abdennagy B, Hott M, Marie PJ 1992 Effects of platelet-derived growth factor on human and mouse osteoblastic cells isolated from the trabecular bone surface. *Cell Biol Int Rep* **16**:235-247.
  53. Howes R, Bowness JM, Grotendorst GR, Martin GR, Reddi AH 1988 Platelet-derived growth factor enhances demineralized bone matrix-induced cartilage and bone formation. *Calcif Tissue Int* **42**:34-38.
  54. Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, Marsh DR 1995 Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone* **16(4)**:455-60.
  55. Canalis E, Varghese S, McCarthy TL, Centrella M 1992 Role of platelet derived growth factor in bone cell function. *Growth Regul* **2**:151-155.
  56. Nash T, Howlett C, Martin C, Steele J, Johnson K, Hicklin D 1994 Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* **15**:203-208.
  57. Rosen V, Thies R 1995 *The Cellular and Molecular Basis of Bone Formation and Repair* Molecular Biology Intelligence Unit. R.G. Landes Company - Springer-Verlag, Georgetown, Texas.
  58. Lind M 1996 Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* **67(4)**:407-17.
  59. Izumi T, Scully SP, Heydemann A, Bolander ME 1992 Transforming growth factor beta 1 stimulates type II collagen expression in cultured periosteum-derived cells. *J Bone Miner Res* **7(1)**:115-21.
  60. Tanaka T, Taniguchi Y, Gotoh K, Satoh R, Inazu M, Ozara H 1993 Morphological study of recombinant human transforming growth factor beta 1-induced intramembranous ossification in neonatal rat parietal bone. *Bone* **14**:117-123.
  61. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME 1990 Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* **110(6)**:2195-207.
  62. Joyce ME, Terek RM, Jingushi S, Bolander ME 1990 Role of transforming growth factor-beta in fracture repair. *Ann N Y Acad Sci* **593**:107-23.
  63. Bonewald LF, Mundy GR 1990 Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin*

- Orthop **250**:261-276.
64. Matsumoto K, Matsunaga S, Imamura T, Ishidou Y, Yoshida H, Sakou T 1994 Expression and distribution of transforming growth factor-beta and decorin during fracture healing. *In Vivo* **8**(2):215-9.
  65. Sumner D, Turner T, Purchio A, Gombotz W, Urban R, Galante J 1995 Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta. *JBJS* **77**:1135-1147.
  66. Si X, Jin Y, Yang L, Tipoe GL, White FH 1997 Expression of BMP-2 and TGF-beta 1 mRNA during healing of the rabbit mandible. *Eur J Oral Sci* **105**(4):325-30.
  67. Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG 1998 The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop* (355 Suppl):S294-300.
  68. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, Dudziak ME, Luchs JS, Saadeh PB, Gittes GK, Longaker MT 2000 Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg* **105**(6):2028-38.
  69. Urist M 1965 Bone: Formation by autoinduction. *Science* **150**:893-899.
  70. Reddi A 1981 Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Col Rel Res* **1**:209-226.
  71. Gitelman SE, Kobrin MS, Ye JQ, Lopez AR, Lee A, Derynck R 1994 Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo. *J Cell Biol* **126**(6):1595-609.
  72. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ 1996 Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* **19**(1 Suppl):1S-12S.
  73. Lind M 1998 Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* **283**:2-37.
  74. Wolff J 1892 Das Gesetz der Transformation der Knochen. In: Hirschwald EA (ed.), Berlin.
  75. Boskey A, Posner A 1984 Bone Structure, Composition, and Mineralization. *Orthopedic Clinics of North America* **15**(4):597-613.
  76. Vasikaran S, Khan S, McCloskey E, Kanis J 1995 Sustained response to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. *Bone* **17**(517-520).
  77. Boyde A, Elliott J, Jones S 1993 Stereology and histogram analysis of backscattered electron images: age changes in bone. *Bone* **14**:205-210.
  78. Jowsey J 1960 Age changes in human bone. *Clin Orthop Rel Res* **17**:210-217.
  79. Reid S, Boyde A 1987 Changes in the mineral density distribution in human bone with age: image analysis using backscattered electrons in SEM. *J Bone Mineral Res* **2**:13-22.
  80. Parfitt A, Mundy G, Roodman G, Hughes D, Boyce B 1996 A new model for the regulation of bone resorption with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res* **10**:466-473.
  81. Frost H 1969 Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* **3**:211-237.
  82. Frost H 1989 Some ABCs of skeletal pathophysiology I: Introduction to the series. *Calcif Tissue Int* **45**:1-3.
  83. Eriksen E, Gundersen H, Melsen F, Mosekilde L 1984 Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Rel Res* **5**:243-252.
  84. Jayasinghe J, Jones S, Boyde A 1993 Scanning electron microscopy of human lumbar vertebral trabecular bone surfaces. *Virchows Archiv A Pathol Anat* **422**:25-34.

85. Parfitt A 1994 Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* **55**:273-286.
86. Eriksen E, Axelrod D, Melsen F 1994 Bone Histomorphometry. Raven Press, New York.
87. Turner C, Forwood M 1995 What role does the osteocyte network play in bone adaptation? *Bone* **16**:283-285.
88. Mori S, Burr D 1993 Increased intracortical remodeling following fatigue damage. *Bone* **14**:103-109.
89. Jaworski Z, Meunier P, Frost H 1972 Observations on two types of resorption cavities in human lamellar cortical bone. *Clin Orthop Rel Res* **83**:279-285.
90. Croucher P, Gilks W, Compston J 1995 Evidence for interrupted bone resorption in human iliac cancellous bone. *J Bone Miner Res* **10**:1537-1543.
91. Gördes W, Walcher K 1972 Nachweismethoden des Knochenan- und umbauens. *Arch orthop Unfall-Chir* **74**:237-246.
92. Nefussi JR, Sautier JM, Nicolas V, Forest N 1991 How osteoblasts become osteocytes: A decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale* **19**:75-82.
93. Parfitt AM 1983 The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. In: Recker RR (ed.) *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 143-223.
94. Burr D, Schaffler M, Yang K, Wu D, Lukoschek M, Kandzari D, Sivaneri N, Blaha J, Radin E 1989 The effects of altered strain environments on bone tissue kinetics. *Bone* **10**:215-221.
95. Lanyon L 1989 Strain-related bone modeling and remodeling. *Top Geriatr Rehabil* **4**:13-24.
96. Boyce T, Bloebaum R 1993 Cortical aging differences and fracture implications for the human femoral neck. *Bone* **14**:769-778.
97. Jaworski Z, Lok E 1972 The Rate of Osteoclastic Bone Erosion in Haversian Remodeling Sites of Adult Dog's Rib. *Calcif Tiss Res* **10**:103-112.
98. Gryn timer M, Alpert B, Katz I, Liebermann I, Pritzker K 1991 Subchondral Bone in Osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* **49**:20-26.
99. Kragstrup J, Melsen F 1983 Three-dimensional morphology of trabecular bone osteons reconstructed from serial sections. *Metab Bone Dis Rel Res* **5**:127-130.
100. Dempster D, Shane E, Horbert W, Lindsay R 1986 A simple method for correlative light and scanning electron microscopy of human iliac crest bone biopsies. Qualitative observations in normal and osteoporotic subjects. *J Bone Miner Res* **1**:15-21.
101. Hahn M, Vogel M, Amling M, Ritzel H, Delling G 1995 Microcallus formations of the cancellous bone: A quantitative analysis of the human spine. *J Bone Miner Res* **10**:1410-1416.
102. Mosekilde L 1993 Vertebral structure and strength in vivo and in vitro. *Calcif Tissue Int* **53**:S121-S126.
103. Schnettler R, Dingeldein E, Herr G 1998 Defektaufbau mit demineralisierter Knochenmatrix. *Orthopäde* **27**:80-88.
104. Mosekilde L, Weisbrode S, Safron J, Stills H, Jankowsky M, Ebert D, Danielsen C, Sogaard C, Franks A, Stevens M, Paddock C, Boyce R 1993 Calcium-Restricted Ovariectomized Sinclair S-1 Minipigs: An Animal Model of Osteopenia and Trabecular Plate Perforation. *Bone* **14**:379-382.
105. Capen CC, Rosol TJ 1989 *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, Philadelphia.
106. McLain RF, Yerby SA, Moseley TA 2002 Comparative Morphometry of L4 Vertebrae: Comparison of Large Animal Models for the Human Lumbar Spine. *Spine* **27**(8):E200-E206.

107. Mullender M, Huiskes R, Versleyen H, Buma P 1996 Osteocyte Density and Histomorphometric Parameters in Cancellous Bone of the Proximal Femur in Five Mammalian Species. *J Orthop Res* **14**(972-979).
108. Mosekilde L 1995 Assessing Bone Quality - Animal Models in Preclinical Osteoporosis Research. *Bone* **17**(4, Suppl):343S-352S.
109. Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A 1987 Compressive Strength, Ash Weight, and Volume of Vertebral Trabecular Bone in Experimental Fluorosis in Pigs. *Calcif Tissue Int* **40**:318-322.
110. Aerssens J, Boonen S, Lowet G 1998 Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* **139**:663-670.
111. Panepinto LM, Phillips RW, Wheeler LR, Will DH 1978 The Yucatan miniature pig as a laboratory animal. *Lab Anim Sci* **28**(3):308-13.
112. Panepinto LM, Phillips RW 1986 The Yucatan miniature pig: characterization and utilization in biomedical research. *Lab Anim Sci* **36**(4):344-7.
113. Bab I, Gazit D, Massarawa A, Sela J 1985 Removal of tibial marrow induces increased formation of bone and cartilage in rat mandibular condyle. *Calcif Tissue Int* **37**:551-555.
114. Einhorn T, Simon G, Devlin V, Warman J, Sidhu S, Vigorita V 1990 The Osteogenic Response to Distant Skeletal Injury. *JBJS* **72A**(9):1374-1378.
115. Gazit D, Karmish M, Holzman L, Bab I 1990 Regenerating marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis. *Endocrinology* **126**:2607-2613.
116. Müller M, Schilling T, Minne H, Ziegler R 1991 A systemic acceleratory phenomenon (SAP) accompanies the regional acceleratory phenomenon (RAP) during healing of a bone defect in the rat. *J Bone Miner Res* **6**:401-410.
117. Suva L, Seedor J, Endo N, Quartuccio H, Thompson D, Bab I, Rodan G 1993 Pattern of gene expression following rat tibial marrow ablation. *J Bone Miner Res* **8**:379-388.
118. Dekel S, Lenthall G, Francis M 1981 Release of Prostaglandins from Bone and Muscle after Tibial Fracture. An Experimental Study in Rabbits. *JBJS* **63-B**(2):185-189.
119. Meller Y, Kestenbaum R, Mozes M, Mozes G, Yagil R, Shany S 1984 Mineral and Endocrine Metabolism during Fracture Healing in Dogs. *Clin Orthop* **187**:289-295.
120. Meller Y, Shaikin-Kestenbaum R, Shany S, Zuilli I, Yankowitz N, Giat J, Konforti A, Torok G 1984 Parathyroid Hormone, Calcitonin, and Vitamin D Metabolites during Normal Fracture Healing in Humans. A Preliminary Report. *Clin Orthop* **183**:238-245.
121. Simmons D 1985 Fracture Healing Perspectives. *Clin Orthop* **200**:100-113.
122. Bab I, Gazit D, Muhlrad A, Shteyer A 1988 Regenerating Bone Marrow Produces a Potent Growth-Promoting Activity to Osteogenic Cells. *Endocrinology* **123**:345-352.
123. Foldes J, Naparstek E, Statter M, Menczel J, Bab I 1989 Osteogenic response to marrow aspiration: increased serum osteocalcin and alkaline phosphatase in human bone marrow donors. *J Bone Miner Res* **4**:643-646.
124. Bab I, Einhorn T 1994 Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone marrow repair. *J Cell Biochem* **55**:358-65.
125. Enneking W 1948 The Repair of Complete Fractures of Rat Tibias. *Anat Record* **101**:515-537.
126. White AI, Panjabi M, Southwick W 1977 The Four Biomechanical Stages of Fracture Repair. *JBJS* **59-A**:188-192.
127. Urist M, Silverman B, Büring K, Dubuc F, Rosenberg J 1967 The Bone Induction Principle. *Clin Orthop* **53**:243-283.
128. Ilizarov G 1989 The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop* **238**:249-281.

129. Kowalewski K, Yong S 1967 Bone and Urinary Hydroxyproline in Normal and Hypothyroid Rat with a Long Bone Fracture. *Acta Endocrinol* **56**:547-553.
130. Singh L, Della Rosa R, Dunphy J 1968 Mobilization of Calcium in Fractured Bones in Rats. *Surg Gynec and Obstet* **126**(243-248).
131. Günzel I, Müller W 1973 Bone Mineral Metabolism in Mice after Fracture of Tibiae, Double Labelling with <sup>47</sup>CA and <sup>224</sup>RA. *Biophysik* **10**:267-272.
132. Andersson S, Nilsson B 1979 Changes in Bone Mineral Content following Tibial Shaft Fractures. *Clin Orthop* **144**(226-229).
133. Lowe J, Bab I, Stein H, Sela J 1983 Primary Calcification in Remodeling Haversian Systems following Tibial Fracture in Rats. *Clin Orthop* **176**:291-297.
134. Müller M, Schilling T, Minne H, Ziegler R 1992 Does immobilization influence the systemic acceleratory phenomenon that accompanies local bone repair? *J Bone Miner Res* **7**:S425-S427.
135. Schilling T, Müller M 1994 Das Systemische Akzeleratorische Phänomen (SAP) - Lokale Knochenreparatur führt zu systemischer Osteogenesestimulation am Gesamtskelett. *Osteo Int* **1**:11-27.
136. Einhorn T 1992 Clinical applications of recombinant gene technology: bone and cartilage repair. *Cells Materials* **2**:1-11.
137. Tajana G, Morandi M, Zembo M 1989 The structure and development of osteogenetic repair tissue according to Ilizarov technique in man: characterization of extracellular matrix. *Orthopedics* **12**:515-523.
138. Aronson J, Good B, Stewart C, Harrison B, Harp J 1990 Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* **250**:43-49.
139. Buckley M, Banes A, Levin L, Sumpio B, Sato M, Jordan R, Gilbert J, Link G, Tran Son Tay R 1988 Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. *Bone Miner* **4**:225-236.
140. Strafford B, Brighton C, Williams J, Pollack S 1989 The in vitro response of bone cells to cyclic biaxial mechanical strain. *Trans Orthop Res Soc* **14**:285.
141. Brighton C, Strafford B, Gross S, Leatherwood D, Williams J, Pollack S 1991 The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain. *JBJS [Am]* **73**:320-331.
142. Brighton C, Sennett B, Farmer J, Iannotti J, Hansen C, Williams J, Williamson J 1992 The inositol phosphate pathway as a mediator in the proliferative response of rat calvarial bone cells to cyclic biaxial mechanical strain. *J Orthop Res* **10**:385-393.
143. Neidlinger-Wilke C, Wilke H, Claes L 1994 Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental model and its application. *J Orthop Res* **12**:70-78.
144. Mundy G 1993 Factors which stimulate bone growth in vivo. *Growth Reg* **3**:124-128.
145. Marie P, Marinesco G 1891 Sur l'anatomie pathologique de l'acromegalie. *Arch med Exper* :539-565.
146. Cushing HW 1909 Is the pituitary gland essential to the maintenance of life? *John Hopkins Hosp Bull* :105.
147. Evans HM, Long JA 1921 The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity and oestrous cycle of the rat. *Anat Rec* **21**:62-63.
148. Raben MS 1958 Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **18**:901-903.
149. Knobil E, Greep R 1959 The physiology of growth hormone with specific reference to its action in

- the Rhesus monkey and the "species specificity problem". *Rec. Progr. Horm. Res.* **15**:1-69.
150. Brook CGD, Hindmarsh PC, Stanhope R 1988 Growth hormone and growth hormone secretion. *J Endocrinol* **119**:179-184.
  151. Lewis U, Dunn J, Bonewald L, Seavey B, VanderLaan W 1978 A naturally occurring variant of human growth hormone. *J Biol Chem* **253**:2679-2687.
  152. Lewis U, Singh R, Bonewald L, Lewis L, VanderLaan W 1979 Human growth hormone: Additional members of the complex. *Endocrinology* **104**:1256-1265.
  153. Lewis U, Singh R, Bonewald L, Seavey B 1981 Altered proteolytic cleavage of human growth hormone as a result of deamidation. *J Biol Chem* **256**:11645-11650.
  154. Diaz M, Dominguez F, Haro L, Ling N, Devesa J 1993 A 12-kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in human pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab* **77**:134-138.
  155. Wilhelmi AE 1955 Comparative Biochemistry of Growth hormone from Ox, Sheep, Pig, Horse and Fish Pituitaries. In: Smith RW, Gaebler OH (eds.) *The hypophyseal growth hormone, nature and actions*. McGraw-Hill Book Comp., New York, pp 59-69.
  156. Ottaway JH 1959 Purification of Growth Hormone from Pig Pituitaries. *Biochem J.* **72**:22P-23P.
  157. Papkoff H, Li CH, Liu W-R 1962 The Isolation and Characterisation of Growth Hormone from Porcine Pituitaries. *Arch Biochem Biophys* .
  158. Wilhelmi AE, Mills JB 1972 Studies on the Primary Structure of Porcine Growth Hormone. In: Pecile A, Müller EE (eds.) *Growth and Growth Hormone*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 28-31.
  159. Guillemin R, Zeytin F, Ling N, Bohlen P, Esch F, Brazeau P, Bloch B, Wehrenberg WB 1984 Growth hormone-releasing factor: chemistry and physiology. *Proc Soc Exp Biol Med* **175**(4):407-13.
  160. Bohlen P, Esch F, Brazeau P, Ling N, Guillemin R 1983 Isolation and characterization of the porcine hypothalamic growth hormone releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* **116**(2):726-34.
  161. Burgus R, Ling N, Butcher M, Guillemin R 1973 Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(3):684-8.
  162. Thorner MO, Vance ML, Hartman ML, Holl RW, al. e 1990 Physiological role of somatostatin on growth hormone regulation in humans. *Metabolism* **39**(Suppl 2):40.
  163. Delitala G, Tomasi P, Viridis R 1988 Neuroendocrine regulation of human growth hormone secretion. Diagnostic and clinical applications. *J Endocrinol Invest* **11**:441-462.
  164. Albertsson-Wikland K, Isaksson O 1976 Development of responsiveness of young normal rats to growth hormone. *Metabolism* **25**:747-759.
  165. Corpas E, Harman M, Blackman M 1993 Human growth hormone and human aging. *Endocrine Rev* **14**:20-39.
  166. Wüster C 1993 Growth hormone and bone metabolism. *Acta Endocrinologica* **128**(Suppl 2):14-18.
  167. Jansson J, Eden S, Isaksson O 1985 Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine Rev* **6**:128-150.
  168. Garnier P, Raynaud F, Job JC 1988 Growth hormone secretion during sleep. I. Comparison with GH response to conventional pharmacological stimuli in pubertal and early pubertal short subjects. Effects of treatment with human GH in patients with discrepant measurements of GH secretion. *Horm Res* **29**:133-139.
  169. Barreca T, Reggiani E, Franceschini F, Bavastro G, Messina V, Menichetti G, Odaglia G, Rolandi



- E 1988 Serum prolactin, growth hormone and cortisol in athletes and sedentary subjects after submaximal and exhaustive exercises. *J Sports Med Phys Fitness* **28**:89-92.
170. Hartmann M, Veldhuis J, Johnson M, Lee M, Alberti K, Samojlik E, Thorner M 1992 Augmented growth hormone (GH) secretory burst frequency and amplitude mediate enhanced GH secretion during a two day fast in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* **74**:757-765.
  171. Veldhuis J, Iranmesh A, Ho K, Waters M, Johnson M, Lizzaralde G 1991 Dual defects in pulsatile growth hormone secretion and clearance subserve the hyposomatotropism of obesity in man. *J Clin Endocrinol Metab* **72**:51-59.
  172. Asplin CM, Faria ACS, Carlsen EC, Vaccaro VA, Barr RE, Iranmesh A, Lee MM, Veldhuis JD, Evans WS 1989 Alterations in the pulsatile mode of growth hormone release in men and women with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **69**:239-245.
  173. Rose SR, Ross JL, Uriarte M, et al 1988 The advantage of measuring stimulated as compared with spontaneous growth hormone levels in the diagnosis of growth hormone deficiency. *New Engl J Med* **319**:201-207.
  174. Salmon WD, Daughaday WH 1957 A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* **49**:825-836.
  175. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Van den Brande JL, Van Wyk JJ 1972 Somatomedin: Proposed designation for sulphation factor. *Nature* **235**:107.
  176. Van Wyk JJ, Underwood LE, Hintz RL, Clemmons DR, Voina SJ, Weaver RP 1974 The somatomedins: A family of insulinlike hormones under growth hormone control. *Recent Prog Horm Res* **30**:259-318.
  177. Daughaday WH, Hall K, Salmon WD, Van den Brande JL, Van Wyk JJ 1987 On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors (letter). *J Clin Endocrinol Metab* **65**:1075-1076.
  178. Schoenle E, Zapf J, Humbel RE, Froesch ER 1982 Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature* **296**:252-253.
  179. Morikawa M, Nixon T, Green H 1982 Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* **29**:783-789.
  180. Green H, Morikawa M, Nixon T 1985 A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation* **29**:195-198.
  181. Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson JO, Isaksson OG 1986 Effects of local administration of GH and IGF-I on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol* **250**:E367-E372.
  182. Schlechter NL, Russell SM, Spencer EM, Nicoll CS 1986 Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(20):7932-4.
  183. Ohlsson C, Isgaard J, Tornell J, Nilsson A, Isaksson OG, Lindahl A 1993 Endocrine regulation of longitudinal bone growth. *Acta Paediatr* **82**(Suppl 391):33-40.
  184. Kupfer SR, Underwood LE, Baxter RC, Clemmons DR 1993 Enhancement of anabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I by use of agents simultaneously. *J Clin Invest* **91**:391.
  185. Isaksson O, Jansson J-O, Gause I 1982 Growth Hormone Stimulates Longitudinal Bone Growth Directly. *Science* **216**:1237-1239.
  186. Madsen K, Friberg U, Roos P, Eden S, Isaksson O 1983 Growth hormone stimulates the proliferation of the cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage. *Nature* **304**:545-547.
  187. Lindahl A, Isgaard J, Carlsson L, Isaksson O 1987 Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinology* **121**:1061-1069.

- 
188. Mercola K, Cline M, Golde D 1981 Growth hormone stimulation of normal and leukemic human T-lymphocyte proliferation in vitro. *Blood* **58**:337-340.
189. Nixon B, Green H 1984 Growth hormone promotes differentiation of myoblasts and preadipocytes generated by azacytidine treatment of 10T1/2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:3429-3432.
190. Leung D, Spencer S, Cachianes G, Hammonds R, Collins C, Henzel W, Barnard R, Waters M, Wood W 1987 Growth hormone receptor and serum binding protein: Purification, cloning and expression. *Nature* **330**:537-543.
191. Bazan J 1989 A novel family of growth factor receptors: A common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun* **164**:788-795.
192. Cunningham B, Ultsch M, De Vos A, Mulkerrin M, Clauser K, Wells J 1991 Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* **254**:821-825.
193. Duquesnoy P, Sobrier M, Duriez B, Dastot F, Buchanan C, Savage M, Preece M, Craescu C, Blouquit Y, Goossens M, Amselem S 1994 A single amino acid substitution in the exoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor confers familial GH resistance (Laron syndrome), with positive GH-binding activity by abolishing receptor homodimerization. *EMBO J* **13**:1386-1395.
194. Vikman K, Carlsson B, Billig H, Eden S 1991 Expression and regulation of growth hormone (GH) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) in rat adipose tissue, adipocytes, and adipocyte precursor cells: GH regulation of GH receptor mRNA. *Endocrinology* **129**:1155-1161.
195. Sotiropoulos A, Goujon L, Simonin G, Kelly P, Postel-Vinay M-C, Finidori J 1993 Evidence for generation of the growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. *Endocrinology* **132**:1863-1865.
196. Smith W, Kuniyoshi J, Talamantes F 1989 Mouse serum growth hormone (GH)-binding protein has GH receptor extracellular and substituted transmembrane domains. *Mol Endocrinol* **3**:984-990.
197. Baumann G 1994 Growth hormone-binding proteins: State of the art. *J Endocrinol* **141**:1-6.
198. Eriksen E, Kassem M, Langdahl B 1996 Growth Hormone, Insulin-like Growth Factors and Bone Remodelling. *Europ J Clin Invest* **26**:525-534.
199. Baumann G, Shaw M 1990 A second, lower affinity growth hormone-binding protein in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **70**:680-686.
200. Veldhuis J, Johnson M, Faunt L, Mercado M, Baumann G 1993 Influence of the high-affinity growth hormone (GH)-binding protein on plasma profiles of free and bound GH and on the apparent half-life of GH. *J Clin Invest* **91**:629-641.
201. Baumann G, Amburn K, Buchanan T 1987 The effect of circulating growth hormone-binding protein on metabolic clearance, distribution and degradation of human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **64**:657-660.
202. Davis S, Graf M, Morrison C, Hall T, Swift P 1992 Identification and partial purification of serum growth hormone-binding protein in domestic animal species. *J Anim Sci* **70**:773-780.
203. Baumann G, Amburn K, Shaw M 1988 The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: A major constituent of plasma GH in man. *Endocrinology* **122**:976-984.
204. Murphy L, Bell G, Friesen H 1987 Growth hormone stimulates sequential induction of c-myc and insulin-like growth factor I expression in vivo. *Endocrinology* **115**:1625-1631.
205. Mathews L, Norstedt G, Palmiter R 1986 Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:9343-9347.
206. Bichell D, Kikuchi K, Rothwein P 1992 Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor I gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol* **6**:1899-1908.

207. Daughaday W, Rotwein P 1989 Insulin-like growth factor I and II. Peptide, messenger reibonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Reviews* **10**:68-91.
208. Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, al e 1993 Insulin-like growth factor binding proteins. *Recent Prog Horm Res* **64**:99.
209. Jones JI, D'Ercole AJ, Camacho-Hubner C, Clemmons DR 1991 Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein I in cell culture and in vivo: Effects on affinity for IGF\_I. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:7481-7485.
210. Mohan S, Bautista CM, Wergedal J, Baylink DJ 1989 Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: a potential candidate for fixing IGF-II in human bone. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:8338-8342.
211. Feyen JHM, Evans DB, Binkert C, Heinrich GF, Geisse S, Kocher HP 1991 Recombinant human [Cys<sup>281</sup>]insulin-like growth factor-binding protein II inhibits both basal and insulin-like growth factor I-stimulated proliferation and collagen synthesis in fetal rat calvaria. *J Biol Chem* **266**:19469-19474.
212. Slootweg MC, Ohlsson C, Salles J-P, de Vries CP, Netelenbos JC 1995 Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* **136**:4210-4217.
213. Schmid C, Schl pfer I, Peter M, Boni-Schnetzler M, Schwander J, Zapf J, Froesch ER 1994 Growth hormone and parathyroid hormone stimulate IGFBP-3 in rat osteoblasts. *Am J Physiol* **267**(2 Pt 1):E226-33.
214. Bautista CM, Baylink DJ, Mohan s 1991 Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: A potential candidate for fixing IGF-II in human bone. *Biochem Biophys Res Commun* **176**:756-763.
215. Shimasaki S, Ling N 1991 Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, and -6). *Prog Growth Factor Res* **3**:243-266.
216. Valcavi R, Zini M, Davoli S, Porrioli I 1992 The late growth hormone rise induced by oral glucose is enhanced by cholinergic stimulation with pyridostigmine in normal subjects. *Clin Endocrinol* **37**:360.
217. Fineberg SE, Merimee TJ 1974 Acute metabolic effects of human growth hormone. *Diabetes* **23**:499.
218. Kostyo JL, Reagan C 1976 The biology of growth hormone. *Pharmacol Ther* **2**:591.
219. Turkalj I, Keller U, Ninnis R, Vosmeer S, Stauffacher W 1992 Effect of increasing doses of recombinant insulin-like growth factor-I on glucose, lipid and leucine metabolism in man. *J Clin Endocrinol Metab* **75**:1186.
220. Merimee TJ, Rabinowitz D 1973 A survey of growth hormone secretion and action. *Metabolism* **22**:1235.
221. Imaki T, Shibasaki T, Shizume K, Masuda A, al e 1985 The effect of free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing hormone-mediated growth hormone secretion in man. *J clin Endocrinol Metab* **60**:290.
222. Matthews DE, Battezzati A 1994 Substrate kinetics and catabolic hormones. In: Kinney JM, Tucker HN (eds.) *Organ metabolism and nutrition: ideas for future critical care*. Raven Press, New York, pp 1.
223. Fryburg DA, Louard RJ, Gerow KE, Gelfand RA, Barrett EJ 1992 Growth hormone stimulates skeletal muscle protein synthesis and antagonizes insulin antiproteolytic action in humans. *Diabetes* **41**:424.
224. Knox JB, Demlin R, Wilmore D, Sarraf P, Santos A 1995 Hypercalcemia associated with the use of human growth hormone in an adult surgical intensive care unit. *Arch Surg* **130**:442.

- 
225. Evans HM, Uyei N, Bartz QR, Simpson ME 1938 The purification of the anterior pituitary growth hormone by fractionation with ammonium sulfate. *Endocrinology* **22**:483-492.
226. Li CH, Evans HM, Simpson ME 1945 Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. *J Biol Chem* **159**:353-366.
227. Wilhelmi AE, Fishman JB, Russell JB 1948 A new preparation of crystalline growth hormone. *J Biol Chem* **176**:735-745.
228. Goeddel DV, Heynecker HL, Hozumi T, Arentz R, Itakura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozz G, Crea R, Seeburg PH 1979 Direct expression E. Coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* **281**:544-548.
229. Hintz RL, Rosenfeld RG, Wilson DM, Bennett A, Finno J, McClellan B, Swift R 1982 Biosynthetic methionyl human growth hormone is biologically active in adult man. *Lancet* **1**:1276.
230. Bierich JR 1989 Therapy with growth hormone - old and new indications. *Hormone Res* **32**:153-165.
231. Rosenfeld RG, Hintz RL, Johanson AJ, Sherman B, Brasel JA, Burstein S 1988 Three year results of a randomized prospective trial of methionyl human growth hormone and oxandrolone in Ullrich Turner syndrome. *J Pediatr* **133**:393-400.
232. Hokken-Koelega AC, Stijnen T, Muinch D, Keizer-Schrama SM, al e 1991 Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of growth hormone treatment in prepubertal children with chronic renal failure. *Lancet* **338**:585-590.
233. Nilsson KO 1989 What is the value of growth hormone treatment in short children with a specified syndrome? Turner's syndrome, osteochondrodysplasia, Prader-Willi syndrome, Noonan syndrome. *Acta Pediatr Scand* **362**(Suppl):61-68.
234. Gertner JM, Genel M, Gianfredi SP, al e 1984 Prospective clinical trial of human growth hormone in short children without growth hormone deficiency. *J Pediatr* **104**:172-176.
235. Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sonksen PH 1989 The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *New Engl J Med* **321**:1797-1803.
236. Crist DM, Peake GT, Egan PA, al e 1988 Body composition response to exogenous GH during training in highly conditioned adults. *J Appl Physiol* **65**:579-584.
237. Ponting GA, Teale JD, Halliday D, Sim AJD 1988 Postoperative positive nitrogen balance with intravenous hyponutrition and growth hormone. *Lancet* **1**:438-440.
238. Tacke J, Bolder U, Löhlein D 1994 Improved cumulated nitrogen balance after administration of recombinant human growth hormone in patients undergoing gastrointestinal surgery. *Infusionsther Transfusionsmed* **21**:24.
239. Lundeberg S, Belfrage M, Wernerman J, Von der Decken A, al e 1991 Growth hormone improves muscle protein metabolism and whole body nitrogen economy in man durin a hyponitrogenous diet. *Metabolism* **40**:315.
240. Manson JM, Smith RJ, Wilmore DW 1988 Growth hormone stimulates protein synthesis during hypocaloric parenteral nutrition. *Ann Surg* **208**:136.
241. Manson JM, Wilmore DW 1986 Positive nitrogen balance with growth hormone and hypocaloric intravenous feeding. *Surgery* **100**:188.
242. Neely EK, Rosenfeld RG 1994 Use and abuse of human growth hormone. *Annu Rev Med* **45**:407-20.
243. Butenandt O 1994 [Growth hormones today]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **54**(5):253-6.
244. Bauman DE 1999 Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domest Anim Endocrinol* **17**(2-3):101-16.

245. Milsom SR, Breier BH, Gallaher BW, Cox VA, Gunn AJ, Gluckman PD 1992 Growth hormone stimulates galactopoiesis in healthy lactating women. *Acta Endocrinol (Copenh)* **127**(4):337-43.
246. Homburg R, West C, Torresani T, Jacobs HS 1990 A comparative study of single-dose growth hormone therapy as an adjuvant to gonadotrophin treatment for ovulation induction. *Clin Endocrinol (Oxf)* **32**(6):781-5.
247. McGrath MH 1990 Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg* **17**:421.
248. Shernan SK, Demling RH, Lalonde C, Lowe DK, al e 1989 Growth hormone enhances reepithelialization of human split-thickness skin graft donor sites. *Surg Forum* **40**:37.
249. Gilpin DA, Barrow RE, Rutan RL, Broemeling L, Herndon DN 1994 Recombinant human growth hormone accelerates wound healing in children with large cutaneous burns. *Ann Surg* **220**:19.
250. Rutan RL, Broemeling LD, Barrow RE, Herndon DN 1994 Cost effectiveness of growth hormone therapy in pediatric burn patients. *Abstract Volume 9th Congr Int Soc Burn Injuries* :119.
251. Herndon DN, Hawkins HK, Nguyen TT, Pierre E, al e 1995 Characterization of growth hormone enhanced donor site healing in patients with large cutaneous burns. *Ann Surg* **221**:649.
252. Saito H, Tanikawa K, Hiramutu T, Morioka Y 1990 Growth hormone treatment enhances immune function in surgically stressed rats. *JPEN* **14**(Suppl):10.
253. Vara-Thorbeck R, Guerrero JA, Rosell J, Ruiz-Requena E, Capitan JM 1993 Exogenous growth hormone: effects on the catabolic response to surgically produced acute stress and on postoperative immune function. *World J Surg* **17**:530.
254. Melarvie S, Jeevanandam M, Holaday NJ, Retersen SR 1995 Pulsatile nature of growth hormone levels in critically ill trauma victims. *Surgery* **117**:402.
255. Ross R, Miell J, Freeman E, Jones J, al e 1991 Critically ill patients have high basal growth hormone levels with attenuated oscillatory activity associated with low levels of insulin-like growth factor-I. *Clin Endocrinol* **35**:47.
256. Koea JB, Gallaher BW, Breier BH, Douglas RG, al e 1992 Passive immunization against circulating insulin-like growth factor-I (IGF-I) increases protein catabolism in lambs: evidence for a physiological role for circulating IGF-I. *J Clin Endocrinol* **135**:279.
257. Jeevanandam M, Ramias L, Shamos RF, Schiller WR 1992 Decreased growth hormone levels in the catabolic phase of severe injury. *Surgery* **11**(495).
258. Wright PD, Johnson IDA 1975 The effect of surgical operation on growth hormone levels in plasma. *Surgery* **77**(479).
259. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT 1991 The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop* (264):295-301.
260. Mosekilde L, Bak B 1993 The effects of growth hormone on fracture healing in rats: a histological description. *Bone* **14**(1):19-27.
261. Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, Kolbeck SF, Weiler A, Raun K, Kappelgard A, Skiaerbaek C, Haas NP 1999 Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* **24**(2):81-8.
262. Bail H, Raschke M, Weiler A, Dahne M, Skjaerbeck C, Haas N 1997 Applikation von rekombinantem Wachstumshormon bei der Distraktionsosteogenese erhöht die Osteoblastenaktivität. *Hefte zum Unfallchirurg* **268**:830-831.
263. Raschke MJ, Kolbeck SF, Dahne M, Lindner T, Raun K, Bail H 2000 [Recombinant growth hormone accelerates regenerate consolidation in distraction osteogenesis]. *Chirurg* **71**(9):1009-15.
264. Rappaport EB, Fife D 1985 Slipped capital femoral epiphysis in growth hormone-deficient patients. *Am J Dis Child* **136**:396-399.

265. Hintz RL 1992 Untoward events in patients treated with growth hormone in the USA. *Horm Res* **38**(Suppl 1):44-9.
266. Wilson DM, Frane JW, Sherman B, al e 1988 Carbohydrate and lipid metabolism in Turner syndrome: effect of therapy with growth hormone, oxandrolone, and a combination of both. *J Pediatr* **112**:210-217.
267. Marcus R, Butterfield G, Holloway L, Gilliland L, Baylink D, Hintz R, Sherman B 1990 Effects of Short Term Administration of Recombinant Human Growth Hormone to Elderly People. *J Clin Endocrinol Metab* **70**(2):519-527.
268. Koch TK, Berg BO, De Armand SJ, Gravina RF 1985 Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism: possible relationship to administration of cadaveric human growth hormone. *New Engl J Med* **313**:731-733.
269. Stahnke N, Zeisel H 1992 Growth hormone therapy and leukemia: an update, 1992. *Horm Res* **38**(Suppl 1):56-62.
270. Lee PDK, Rosenfeld RG, Hintz RL, Smith SD 1986 Characterization of insulin, insulin-like growth factors I and II and growth hormone receptors on human leukemic lymphoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* **62**:28-35.
271. Harris W, Heany R 1969 Effect of growth hormone on skeletal mass in adult dogs. *Nature* **223**:403-404.
272. Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G 1993 Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* **273**(2):279-86.
273. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksen EF 1993 Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int* **52**(3):222-6.
274. Slootweg MC, van Buul-Offers SC, Herrmann-Erlee MP, Duursma SA 1988 Direct stimulatory effect of growth hormone on DNA synthesis of fetal chicken osteoblasts in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)* **118**(2):294-300.
275. Saggese G, Frederico G, Cinquanta L 1993 In vitro effects of growth hormone and other hormones on chondrocytes and osteoblast-like cells. *Acta Paediatr* **82**(Suppl):54-59.
276. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF 1994 Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro. *Growth Regul* **4**(3):131-5.
277. Ono T, Kanzaki S, Seino Y, Baylink DJ, Mohan S 1996 Growth hormone (GH) treatment of GH-deficient children increases serum levels of insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding protein-3 and -5, and bone alkaline phosphatase isoenzyme. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:2111-2116.
278. Slootweg MC 1993 Growth hormone and bone. *Horm Metab Res* **25**(7):335-43.
279. Slootweg MC, Salles JP, Ohlsson C, de Vries CP, Engelbregt MJ, Netelenbos JC 1996 Growth hormone binds to a single high affinity receptor site on mouse osteoblasts: modulation by retinoic acid and cell differentiation. *J Endocrinol* **150**:465-472.
280. Slootweg MC, Hoogerbrugge CM, de Poorter TL, Duursma SA, van Buul-Offers SC 1990 The presence of classical insulin-like growth factor (IGF) type-I and -II receptors on mouse osteoblasts: autocrine/paracrine growth effect of IGFs? *J Endocrinol* **125**(2):271-7.
281. Okazaki R, Conover CA, Harris SA, Spelsberg TC, Riggs BL 1995 Normal human osteoblast-like cells consistently express genes for insulin-like growth factors I and II but transformed human osteoblast cell lines do not. *J Bone Miner Res* **10**:788-795.
282. Wong GL, Kotliar D, Schlaeger D, Brandes SJ 1990 IGF-I production by mouse osteoblasts. *J Bone Miner Res* **5**:133-140.
283. Mohan S, Baylink DJ 1991 Bone growth factors. *Clin Orthop* (263):30-48.
284. Strom P, Ljunghall S, Melhus H 1994 Adult human osteoblast-like cells do not express insulin-like

- growth factor-I. *Biochem Biophys Res Comm* **199**:78-82.
285. Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, Kanatani M, Kobayashi T, Chihara K 1996 Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation. *Endocrinology* **137**(1):35-41.
  286. Ransjö M, Lerner U, Ohlsson C 1996 Growth hormone inhibits formation of osteoclast-like cells in mouse bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* **11**(Suppl):T394.
  287. Sloomweg MC, Most W, van Beek E, Schot LP, Papapoulos SE, Lowik CW 1992 Osteoclast formation together with interleukin-6 production in mouse long bones is increased by insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol* **132**:433-438.
  288. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, Tanaka K, Kumegawa M 1992 Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology* **131**:1075-1080.
  289. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC 1995 Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology* **136**(1):124-31.
  290. Farley JR, Tarbaux N, Murphy LA, Masuda T, Baylink DJ 1987 In vitro evidence that bone formation may be coupled to bone resorption by release of mitogen(s) from resorbing bone. *Metabolism* **36**:314-321.
  291. Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ 1995 The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* **17**(2 Suppl):93S-98S.
  292. Bagi CM, DeLeon E, Brommage R, Adams S, Rosen D, Sommer A 1995 Systemic administration of rhIGF-I or rhIGF-I/IGFBP-3 increases cortical bone and lean body mass in ovariectomized rats. *Bone* **16**:263S-269S.
  293. Holloway L, Butterfield G, Hintz R, Gesundheit N, Marcus R 1994 Effects of recombinant human growth hormone on metabolic indices, body composition, and bone turnover in healthy elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* **79**(2):470-479.
  294. Mohan S, Strong DD, Lempert UG, Tremollieres F, Wergedal JE, Baylink DJ 1992 Studies on regulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-4 production in human bone cells. *Acta Endocrinol* **127**:555-564.
  295. Andress DL, Birnbaum RS 1992 Human osteoblast derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J Biol Chem* **267**:22467-22472.
  296. Sartorio A, Conti A, Monzani M 1993 New markers of bone and collagen turnover in children and adults with growth hormone deficiency. *Postgrad Med J* **69**:816-820.
  297. Bravenboer N, Holzmann P, de Boer H, Blok GJ, Lips P 1996 Histomorphometric analysis of bone mass and bone metabolism in growth hormone deficient adult men. *Bone* **18**:551-557.
  298. Yeh JK, Chen MM, Aloia JF 1995 Skeletal alterations in hypophysectomized rats. I. A histomorphometric study on tibial cancellous bone. *Anat Rec* **241**:505-512.
  299. Amato G, Izzo G, La Montagna G, Bellastella A 1996 Low dose recombinant human growth hormone normalizes bone metabolism and cortical bone density and improves trabecular bone density in growth hormone deficient adults without causing adverse effects. *Clinical Endocrinology* **45**:27-32.
  300. Jorgensen PH, Bak B, Andreassen TT 1991 Mechanical properties and biochemical composition of rat cortical femur and tibia after long-term treatment with biosynthetic human growth hormone. *Bone* **12**(5):353-9.
  301. Andreassen T, Jorgensen P, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund 1995 Growth Hormone Stimulates Bone Formation and Strength of Cortical Bone in Aged Rats. *J Bone Miner Res* **10**(7):1057-1067.
  302. Brixen K, Nielsen HK, Mosekilde L, Flyvbjerg A 1990 A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. *J Bone Miner Res* **5**:609-618.

303. Brixen K, Kassem M, Nielsen HK, Loft AG, Flyvbjerg A, Mosekilde L 1995 Short-term treatment with growth hormone stimulates osteoblastic and osteoclastic activity in osteopenic postmenopausal women: a dose response study. *J Bone Miner Res* **10**:1865-1874.
304. Kassem M, Brixen K, Blum WF, Mosekilde L, Eriksen EF 1994 Normal osteoclastic and osteoblastic responses to exogenous growth hormone in patients with postmenopausal spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res* **9**(9):1365-70.
305. Kruse HP, Kuhlencordt F 1975 On an attempt to treat primary and secondary osteoporosis with human growth hormone. *Horm Metab Res* **7**:488-491.
306. Hansen TB, Brixen K, Vahl N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Mosekilde L, Hagen C 1996 Effects of 12 months of growth hormone (GH) treatment on calciotropic hormones, calcium homeostasis, and bone metabolism in adults with acquired GH deficiency: a double blind, randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:3352-3359.
307. Johannsson G, Rosen T, Bosaeus I, Sjostrom L, Bengtsson BA 1996 Two years of growth hormone (GH) treatment increases bone mineral content and density in hypopituitary patients with adult-onset GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:2865-2873.
308. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Slootweg MC 1998 Growth hormone and bone. *Endocr Rev* **19**(1):55-79.
309. Isgaard J, Moller C, Isaksson OG, Nilsson A, Mathews LS, Norstedt G 1988 Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone. *Endocrinology* **122**:1515-1520.
310. Ohlsson C, Isaksson O, Lindahl A 1992 Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:9826-9830.
311. Hunziker EB, Wagner J, Zapf J 1994 Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *J Clin Invest* **93**(3):1078-86.
312. Laron Z, Anin S, Klipper-Aurbach Y, Klinger B 1992 Effects of insulin-like growth factor on linear growth, head circumference, and body fat in patients with Laron-type dwarfism. *Lancet* **339**:1258-1261.
313. Mathews LS, Hammer RE, Behringer RR, D'Ercole AJ, Bell GI, Brinster RL, Palmiter RD 1988 Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **123**:2827-2833.
314. Clark R, Mortensen D, Carlsson L 1995 Insulin-like growth factor-I and growth hormone (GH) have distinct and overlapping effects in GH-deficient rats. *Endocrine* **3**:297-304.
315. Halse J, Melsen F, Mosekilde L 1981 Iliac crest bone mass and remodelling in acromegaly. *Acta Endocrinologica* **97**:18-22.
316. Kotzmann H, Bernecker P, Hübsch P, Pietschmann P, Woloszczuk W, Svoboda T, Geyer G, Luger A 1993 Bone mineral density and parameters of bone metabolism in patients with acromegaly. *J Bone Miner Res* **8**:459-465.
317. Bijlsma JW, Nortier JW, Duursma SA, Crougths RJ, Bosch R, Thijssen JH 1983 Changes in bone metabolism during treatment of acromegaly. *Acta Endocrinol* **104**:153-159.
318. Diamond T, Nery L, Posen S 1989 Spinal and peripheral bone mineral densities in acromegaly: the effects of excess growth hormone and hypogonadism. *Ann Intern Med* **111**:567-573.
319. Ezzat S, Melmed S, Endres D, Eyre D, Singer F 1993 Biochemical Assessment of Bone Formation and Resorption in Acromegaly. *J Clin Endocrin Metab* **76**(6):1452-1457.
320. Hübsch P, Kotzmann H, Svoboda T, Kainberger F, Bankier A, Seidl G 1993 Knochendichte an Lendenwirbelsäule und Femur bei Akromegalie. *Radiologe* **33**:457-461.
321. Roelfsema F, Sluys Jvd, Smeenk D 1970 Quantitation of bone and bone turnover in biopsy specimens from the iliac crest in acromegaly. *J Endocrinol* **48**:LXI.



322. Schiltz PM, Ohta T, Glass D, Mohan S, Baylink DJ 1992 Growth hormone stimulates cortical bone formation in immature hypophysectomized rats. *Endocr Res* **18**(1):19-30.
323. Chen MM, Yeh JK, Aloia JF 1995 Effect of ovariectomy on cancellous bone in the hypophysectomized rat. *J Bone Miner Res* **10**:1334-1342.
324. Schmidt IU, Dobnig H, Turner RT 1995 Intermittent parathyroid hormone treatment increases osteoblast number, steady state messenger ribonucleic acid levels for osteocalcin, and bone formation in tibial metaphysis of hypophysectomized female rats. 1995 **Endocrinology**(136).
325. Charlton HM, Clark RG, Robinson IC, Goff AE, Cox BS, Bugnon C, Bloch BA 1988 Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *J Endocrinol* **119**:51-58.
326. Wright NN, Renault J, Hollis B, Bell NH, Key LL 1995 Effect of growth hormone on bone: bone mineral density, trabecular bone volume, and alkaline phosphatase improve or are restored in the dwarf rat treated with growth hormone. *J Bone Miner Res* **10**:127-131.
327. Martinez D, Orth M, Carr K, Vanderby RJ, Vailas A 1996 Cortical bone growth and maturational changes in dwarf rats induced by recombinant human growth hormone. *Am J Physiol* **270**:E51-E59.
328. Andreassen T, Melsen F, Oxlund H 1996 The Influence of Growth Hormone on Cancellous and Cortical Bone of the Vertebral Body in Aged Rats. *J Bone Miner Res* **11**(8):1094-1102.
329. Erben RG 1996 Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec* **246**:39-46.
330. Sass D, Jerome C, Bowman A, Bennett-Cain A, Ginn T, LeRoith D, Epstein S 1997 Short-Term Effects of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor I on Cancellous Bone in Rhesus Macaque Monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* **82**(4):1202-1209.
331. Yeh J, Aloia J, Chen M 1994 Growth Hormone Administration Potentiates the Effect of Treadmill Exercise on Long Bone Formation but not on the Vertebrae in Middle-Aged Rats. *Calcif Tissue Int* **54**:38-43.
332. Ortoft G, Oxlund H 1996 Qualitative Alterations of Cortical Bone in Female Rats After Long-Term Administration of Growth Hormone and Glucocorticoid. *Bone* **18**(6):581-590.
333. Rahn BA 1976 Die polychrome Sequenzmarkierung - Intravitale Zeitmarkierung zur tierexperimentellen Analyse der Knochen- und Dentinbildung Kieferorthopädie. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, pp 146.
334. Rahn B, Perren S 1975 Die mehrfarbige Fluoreszenzmarkierung des Knochenanbaus. *Chem. Rundschau* **28**(18):12-15.
335. Milch R, Rall D, Tobie J 1958 Fluorescence of Tetracycline Antibiotics in Bone. *JBJS* **40A**:897-910.
336. Frost H 1963 Measurement of Human Bone Formation by Means of Tetracycline Labeling. *Can J Biochem Physiol* **41**:31-42.
337. Rahn BA, Perren SM 1971 Xylenol Orange, A Fluorochrome Useful in Polychrome Sequential Labeling of Calcifying Tissues. *Stain Technology* **46**:125-128.
338. Rahn BAB, F. C.; Trapp, L.; Perren, S. M. 1980 Methode zur Fluoreszenz-Morphometrie des Knochenanbaus. *Akt. Traumatolog* **10**:109-115.
339. Arighi M, Wilson J 1997 Comparative Effects of Fixation and Storage on Bone Tetracycline Fluorescence. *Vet Comp Orthop Traumatol* **10**:200-204.
340. Panepinto LM, Phillips RW 1981 Genetic selection for small body size in Yucatan miniature pigs. *Lab Anim Sci* **31**(4):403-4.
341. Kossa Jv 1901 Über die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Ziegler's Beitr path Anat* **29**:163-202.

342. Krutsay M 1963 Methode zur Darstellung einzelner Kalziumverbindungen in histologischen Schnitten. *Acta histochem* **15**:189-191.
343. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR 1987 Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units - Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* **2**(6):595-610.
344. Turner rt 1995 Effects of short-term spaceflight and recombinant human growth hormone (rhGH) on bone growth in young rats. *Aviat Space Environ Med* **66**:763-769.
345. Fournier A, Oprisiu R, Said S 1997 Invasive versus non-invasive diagnosis of renal bone disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **6**:333-348.
346. Klaushofer K, Roschger P, Nader A, Glantschnig H, Varga F 1999 Osteoporosis and metabolic bone diseases: clinical relationship. *Wien Med Wochenschr* **149**:463-471.
347. Compston J, Vedi S, Stellon A 1986 Inter-Observer and Intra-Observer Variation in Bone Histomorphometry. *Calcif Tissue Int* **38**:67-70.
348. Wright CDP, Vedi S, Garrahan NJ, Stanton M, Duffy SW, Compston JE 1992 Combined Inter-observer and Inter-method Variation in Bone Histomorphometry. *Bone* **13**:205-208.
349. Wilson A, Bhattacharyya M, Miller S, Mani A, Sacco-Gibson N 1998 Ovariectomy-Induced Changes in Aged Beagles: Histomorphometry of Rib Cortical Bone. *Calcif Tissue Int* **62**:237-243.
350. Newman E, Turner A, Wark J 1995 The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* **16**(suppl):277S-284S.
351. Piert M, Zittel T, Becker G, Jahn M, Stahlschmidt A, Maier G, Machulla H-J, Bares R 2001 Assessment of Porcine Bone Metabolism by Dynamic [<sup>18</sup>F]Fluoride Ion PET: Correlation with Bone Histomorphometry. *J Nucl Med* **42**:1091-1100.
352. Friberg B, Sennerby L, Roos J, Johansson P, Strid C, Lekholm U 1995 Evaluation of bone density using cutting resistance measurements and microradiography. *Clin Oral Impl Res* **6**:164-171.
353. Teng S, Choi I, Herring S, Rensberger J 1997 Stereological Analysis of Bone Architecture in the Pig Zygomatic Arch. *Anat Rec* **248**:205-213.
354. Fazzalari N, Moore R, Manthey B, Vernon-Roberts B 1989 Comparative study of iliac crest and proximal femur histomorphometry in normal patients. *J Clin Pathol* **42**:745-748.
355. Jackson J, Kleerekoper M, Parfitt A, Rao D, Villanueva A, Frame B 1987 Bone Histomorphometry in Hypogonadal and Eugonadal Men with Spinal Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* **65**(1):53-58.
356. Malluche H, Sherman D, Meyer W, Massry S 1982 A New Semiautomatic Method for Quantitative Static and Dynamic Bone Histology. *Calcif Tissue Int* **34**:439-448.
357. Ritzel H, Amling M, Vogel M, Pösl M, Hahn M, Werner M, Delling G 1996 Spongiosastruktur und polyostotische Heterogenität bei Osteoporose. *Pathologe* **17**:68-77.
358. Thomsen J, Boyce R, Mosekilde L 1994 Stochastic Simulation of Vertebral Trabecular Bone Remodeling. *Bone* **15**(6):655-666.
359. Charles P, Eriksen E, Mosekilde L, Melsen F, Jensen F 1987 Bone Turnover and Balance Evaluated by a Combined Calcium Balance and <sup>47</sup>Calcium Kinetic Study and Dynamic Histomorphometry. *Metabolism* **36**(12):1118-1124.
360. Podenphant J, Engel U 1987 Regional Variations in Histomorphometric Bone Dynamics from the Skeleton of an Osteoporotic Woman. *Calcif Tissue Int* **40**:184-188.
361. Kovarik J, Willvonseder R, Plenk HJ, Böhler N, Woloszczuk W, Eschberger J, Dorda W, Haber P 1982 Evidence for Negative Correlation Between Quantitative Histological Studies and Microradiography of Iliac Crest Bone and Forearm Osteodensitometry in Elderly Women with Osteoporosis. *Calcif Tissue Int* **34**:456-458.

- 
362. Schenk R, Merz W, Müller J 1969 A quantitative histological study on bone resorption in human cancellous bone. *Acta anat* **74**:44-53.
363. Stracke H, Schulz A, Weber U, Ullmann J, Schatz H 1987 Osteocalcin und Knochenhistologie bei Osteoporose. *Klin Wochenschr* **65**:1095-1100.
364. Richards A, Mosekilde L, Sogaard G 1994 Normal Age-Related Changes in Fluoride Content of Vertebral Trabecular Bone - Relation to Bone Quality. *Bone* **15**(1):21-26.
365. Holbein O, Neidlinger-Wilke C, Suger G, Kinzl L, Claes L 1995 Ilizarov Callus Distraction Produces Systemic Bone Cell Mitogens. *J Orthop Res* **13**:629-638.
366. Norrdin R, Shih M 1998 Systemic effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on vertebral trabecular remodeling in beagles used in a healing study. *Calcif Tissue Int* **42**:363-8.
367. Sumner D, Turner T, Urban R, Leven R, Hawkins M, Nichols E, McPherson J, Galante J 2001 Locally delivered rhTGF-beta<sub>2</sub> enhances bone ingrowth and bone regeneration at local and remote sites of skeletal injury. *J Orthop Res* **19**:85-94.
368. Crapo L 1986 *Hormone – Die chemischen Boten des Körpers*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

## Anhang

### Makro zur Messung der Mikrostruktur an kortikalem und spongiösem Knochen

#### Methode 1

```
# *****
# DOG-I BoneMorpho
# *****
# User: Julia Funk
# Datum: 06.02.2001
# Autor: Julia Funk/Gert Krummrey
# Charite Berlin - Unfallchirurgie Campus Virchow
# *****
# Messung an von Kossa Schnitten
# *****
# muss noch kalibriert werden !
# *****

# Funktionen einbinden
fcncload "d:/analysis/lib/BILDANALYSE"
BASICVARDEF

# Variablen
_DEMOMODE = _OFF
DEMOFILE = "D:/DATEN/DOGI/WKtest.jpg"
_ONLINE = _OFF
_ENHANCE = _ON
_ROISELECT = _ON
DATAPATH = "D:/daten/dogi"
IMGPATH = "D:/DATEN/dogi"
MSFILE = "DOG-I-WK"
PROJECT = "DOG-I-WK"
EDITFLAG := 1
GF := 0
GFS = ""
FOL := 0
EPI := 0
SUMTOT := 0.0
SUMPOS := 0.0
SUMPRO := 0.0
QUOTIENT := 0.0
TEMP := 0

# Segmentierwerte (default)
PHL := 214
PHH := 170
PLL := 32
PLH := 119
PSL := 0
PSH := 157

PHL2 := 226
PHH2 := 9
PLL2 := 57
PLH2 := 178
PSL2 := 8
PSH2 := 223

# Set MSFILE
MSload "default"
MSsetprop "UNIT", "millimeter"
MSsetprop "POINTFEAT", "DISTANCE"
MSsetprop "DRAWFEAT", "DRLABEL"
MSsetprop "DISTANCEX", 5
MSsetprop "DISTANCEY", 5
MSsetprop "SCALEX", 0.020
MSsetprop "SCALEY", 0.020
# *****

DBsetpath DATAPATH
```

```

if _ONLINE == 1
# kalibrieren
MByesno "Kalibrieren?"
if _STATUS == 1
! tvinput "CALIBRATE"
CaLY "CALIBRATE"
endif
else
read IMGPATH, "Bilderpfad angeben:"
endif
imgsetpath IMGPATH
MSsave MSFILE

# *****
# Hauptschleife (Schnitt)
# *****
while 1
imgdelete "*"
Gclear 0
showwindow "Messages", 1
write "@"
write PROJECT
write ""
write "Schnittname: unbedingt einen neuen"
write "eingeben, sonst falsche Werte"
NAME ="TEST"
read NAME, "Schnittnamen eingeben (8 ZEICHEN) : "
STATISTIK = NAME

# Datenbank-Definitionen
DBnew STATISTIK, 18
DBsetcolumn STATISTIK, 1, "Schnitt", 20, "<none>"
DBsetcolumn STATISTIK, 2, "Messung", 16, "<none>"
DBsetcolumn STATISTIK, 3, "TAr", "Float", "[mm²]"
DBsetcolumn STATISTIK, 4, "TBAr", "Float", "[mm²]"
DBsetcolumn STATISTIK, 5, "TBDn", "Float", "%"
DBsetcolumn STATISTIK, 6, "CoAr", "Float", "[mm²]"
DBsetcolumn STATISTIK, 7, "CoBAr", "Float", "[mm²]"
DBsetcolumn STATISTIK, 8, "CoBDn", "Float", "%"
DBsetcolumn STATISTIK, 9, "CnAr", "Float", "[mm²]"
DBsetcolumn STATISTIK, 10, "CnBAr", "Float", "[mm²]"
DBsetcolumn STATISTIK, 11, "CnBDn", "Float", "%"
DBsetcolumn STATISTIK, 12, "TrabX", "Float", "mm"
DBsetcolumn STATISTIK, 13, "TrabY", "Float", "mm"
DBsetcolumn STATISTIK, 14, "TrabS", "Float", "mm"
DBsetcolumn STATISTIK, 15, "TrabMean", "Float", "mm"
DBsetcolumn STATISTIK, 16, "Länge", "Float", "mm"
DBsetcolumn STATISTIK, 17, "Breite", "Float", "mm"
DBsetcolumn STATISTIK, 18, "Notiz", 20, "<none>"
datalist STATISTIK, 0, 0

# *****
# KNOCHEN messen
# *****
GF = 0
SUMTOT := 0.0
SUMPOS := 0.0
SUMPROZENT := 0.0
while 1
GF = GF + 1
CTR = GF
GFS = string(GF)
imgdelete "WORKPIC"
DELETETMP
Gclear 0
beep 200, 400
if _ONLINE == 1
! tvinput "WORKPIC"
else
if _DEMOMODE
imgload DEMOFILE, "WORKPIC"
else
IMGNAME = NAME + ".JPG"
! imgload IMGNAME, "WORKPIC"
imgdisplay "WORKPIC"

```

```

endif
MByesno "Kalibrieren?"
if _STATUS == 1
    CalY "WORKPIC"
endif
endif
if _ENHANCE == 1
    normalize "WORKPIC","WORKPIC",5
endif
imgdisplay "WORKPIC"
showwindow "Messages",1
Gclear 0

# ROI definieren
MBok "Präparat umfahren"
outlineROI "WORKPIC", "ROIAREA"
imgstatus "WORKPIC", sizex, sizey, sizez, mode
MSgetprop "SCALEX", ScaleX
MSgetprop "SCALEY", ScaleY
MSsetprop "REGIONFEAT", "XMIN, YMIN, XMAX, YMAX"
MSmeasmask "ROIAREA", "WORKPIC", 10, 0,1,0
datalist 10,0,0
DBgetvalue 10, "YMIN", RSy
DBgetvalue 10, "XMIN", RSx
DBgetvalue 10, "YMAX", REy
DBgetvalue 10, "XMAX", REx
PSy = REy - RSy
PSx = REx - RSx
MMSx = ScaleX * PSx
MMSy = ScaleY * PSy
writeFloat "Schnittbreite", MMSx, MM
writeFloat "Schnittlänge", MMSy, MM
ISy = int (MMSy)
Gclear 0

MBok "Epiphysenfugen markieren "
outlineROI "WORKPIC", "EPIPHYSEN"
binxor "ROIAREA", "EPIPHYSEN", "ROIAREA"

# mineralisierten Knochen segmentieren
dislevrgb "WORKPIC","MASK",1,0,PHL,PHH,PLL,PLH,PSL,PSH,10,"HLS"
binand "MASK", "ROIAREA", "MASK"

Gclear 0
imgdisplay "WORKPIC"
MSdrawmask "MASK","WORKPIC"
MByesno "Anfärbung des Knochens OK?"
if _STATUS == 0
    while 1
        beep 100,220
        beep 100,440
        Gclear 0
        write "@"
        write "SEGMENTIEREN:"
        write "-----"
        write "Rechte Maustaste -> Big Display. "
        write "Zum Schluss <X>"
        # ! dislev "WORKPIC",2,LSEG,HSEG,1
        ! dislevrgb "WORKPIC","MASK",1,0,PHL,PHH,PLL,PLH,PSL,PSH,10,"HLS"
        imgdisplay "WORKPIC"
        Gclear 0
        # mit Hintergrundmaske vergleichen
        binand "MASK", "ROIAREA", "MASK"
        imgdisplay "WORKPIC"
        MSdrawmask "MASK","WORKPIC"
        MByesno "Anfärbung OK?"
        if _STATUS == 1 : break
    endwhile
endif

# Binäres Image nachbearbeiten
binscrap "MASK","MASK",0,200,0
binfill "MASK","MASKFILL"

# Interaktives Korrigieren
MByesno "Korrigieren?"

```

```

if _STATUS == 1
  maskEdit "MASK"
endif

# *****

# Gesamtfläche messen
Measure "WORKPIC", "ROIAREA", TAr
writeFloat "TAr", TAr, MM2

# Gesamtknochenfläche messen
Measure "WORKPIC", "MASK", TBar
writeFloat "TBar", TBar, MM2
Percent TBar, TAr, TBDn
writeFloat "TBDn", TBDn, P

# Corticalis messen
MBok "Jetzt die Corticales einzeichnen"
imgcopy "MASK", "CoAr"
imgclear "CoAr", 0
maskEdit "CoAr"
binand "CoAr", "ROIAREA", "CoAr"
binand "CoAr", "MASK", "CoBar"
Measure "WORKPIC", "CoAr", CoAr
writeFloat "CoAr", CoAr, MM2
Measure "WORKPIC", "CoBar", CoBar
writeFloat "CoBar", CoBar, MM2
Percent CoBar, CoAr, CoBDn
writeFloat "CoBDn", CoBDn, P

# Spongiosa messen
binxor "ROIAREA", "CoAr", "CnAr"
Measure "WORKPIC", "CnAr", CnAr
writeFloat "CnAr", CnAr, MM2
binand "MASK", "CnAr", "CnBar"
Measure "WORKPIC", "CnBar", CnBar
writeFloat "CnBar", CnBar, MM2
Percent CnBar, CnAr, CnBDn
writeFloat "CnBDn", CnBDn, P

# Trabekeldicke messen
binscrap "MASKFILL", 10, 0, 50, 0
binclose 10, "TRABMASK", 5, 2
# in X-Ausrichtung
Gclear 0
x := 0
for x = RSx, x < REx, x = x + 5
  Gvector x, RSy, x, REy, 15
endfor
Gmerge "XLINES", 255
Gclear 0
binand "TRABMASK", "XLINES", "XTRAB"
MSsetprop "REGIONFEAT", "FIBRELENGTH, FERETMAX"
RGnew "XTRAB", "WORKPIC"
MSmeasall 10, 0, 1, 1
datalist 10, 0, 0
MSsetprop "FIELDFEAT", "SUMFERET[UNIT]=SUM(FERETMAX), FLDCOUNT[#] = SUM(1) "
MSmeasmask "XTRAB", "WORKPIC", 20, 0, 2, 1
datalist 20, 0, 0
DBgetvalue 20, "SUMFERET", SumFX
DBgetvalue 20, "FLDCOUNT", XFCount
MeanFX = SumFX / XFCount
writeFloat "TrabX", MeanFX, MM
DBdelete 10
DBdelete 20

# in Y-Ausrichtung
Gclear 0
y := 0
for y = RSy, y < REy, y = y + 5
  Gvector RSx, y, REx, y, 15
endfor
Gmerge "YLINES", 255
Gclear 0
binand "TRABMASK", "YLINES", "YTRAB"
MSsetprop "REGIONFEAT", "FIBRELENGTH, FERETMAX"

```

```

RGnew "YTRAB","WORKPIC"
MSmeasall 10,0,1,0
datalist 10,0,0
MSsetprop "FIELDFEAT","SUMFERET[UNIT]=SUM(FERETMAX), FLDCOUNT[#] = SUM(1) "
MSmeasmask "YTRAB", "WORKPIC", 20,0,2,0
datalist 20,0,0
DBgetvalue 20, "SUMFERET", SumFY
DBgetvalue 20, "FLDCOUNT", YFCount
MeanFY = SumFY / YFCount
writeFloat "TrabY", MeanFY, MM
update
DBdelete 10
DBdelete 20

# Sternförmig
Gclear 0
cx := int(sizeX / 2)
cy := int(sizeY / 2)
r := sizeY
write cx,cy
a := 0.0
for a = 0.0, a <= _PI, a = a + _PI / 45
  x1 = int(cx + cos(a) * r)
  y1 = int(cy + sin(a) * r)
  x2 = int(cx - cos(a) * r)
  y2 = int(cy - sin(a) * r)
  Gvector x1,y1,x2,y2,15
endfor
Gmerge "SLINES",255
binand "SLINES", "TRABMASK", "STRAB"
Gclear 0
MSsetprop "REGIONFEAT", "FIBRELENGTH, FERETMAX"
RGnew "STRAB","WORKPIC"
MSmeasall 10,0,1,1
datalist 10,0,0
MSsetprop "FIELDFEAT","SUMFERET[UNIT]=SUM(FERETMAX), FLDCOUNT[#] = SUM(1) "
MSmeasmask "STRAB", "WORKPIC", 20,0,2,0
datalist 20,0,0
DBgetvalue 20, "SUMFERET", SumFS
DBgetvalue 20, "FLDCOUNT", SFCount
MeanFS = SumFS / SFCount
writeFloat "TrabS", MeanFS, MM
update
DBdelete 10
DBdelete 20
Gclear 0
TrabM = (MeanFX + MeanFY + MeanFS) / 3
writeFloat "TrabM", TrabM, MM

read REMARK, "Notiz zu diesem Schnitt?"

# Statistik und Speichern
DBaddline STATISTIK
DBsetvalue STATISTIK,"Schnitt",STATISTIK
DBsetvalue STATISTIK,"Messung",GFS
DBsetvalue STATISTIK,"TAr",TAr
DBsetvalue STATISTIK,"TBAr",TBAr
DBsetvalue STATISTIK,"TBDn",TBDn
DBsetvalue STATISTIK,"CoAr",CoAr
DBsetvalue STATISTIK,"CoBAr",CoBAr
DBsetvalue STATISTIK,"CoBDn",CoBDn
DBsetvalue STATISTIK,"CnAr",CnAr
DBsetvalue STATISTIK,"CnBAr",CnBAr
DBsetvalue STATISTIK,"CnBDn",CnBDn
DBsetvalue STATISTIK,"TrabX",MeanFX
DBsetvalue STATISTIK,"TrabY",MeanFY
DBsetvalue STATISTIK,"TrabS",MeanFS
DBsetvalue STATISTIK,"TrabMean",TrabM
DBsetvalue STATISTIK,"Länge",MMSy
DBsetvalue STATISTIK,"Breite",MMSx
DBsetvalue STATISTIK,"Notiz",REMARK

datalist STATISTIK,0,0

# MByesno "Weiteres Gesichtsfeld?"
# if _STATUS == 0: break

```



```

    break
endwhile
beep 100,440
beep 100,660
pause "Daten speichern!\nListensymbol unten anklicken\nListe mit EDIT/COPY in Excel-Tabelle einfügen",0
MByesno "Weiterer Schnitt?"
if _STATUS == 0: break
endwhile

stop

```

---

## Makro zur Messung der Mikrostruktur an kortikalem und spongiösem Knochen

### Methode 2

```

# *****
# DOG-I-2000
# *****
# User: Julia Funk
# Datum: 25.05.2000
# Autor: Gert Krummrey
# Charite Berlin - Unfallchirurgie Campus Virchow
# *****
# Knochentrabekelmessung
# Fläche, Perimeter, 4 Distanzen
# *****
# DATAPATH: D:/daten/DOG1
# *****
# Funktionen einbinden
# fcnload "DELETETMP"
# fcnload "EDIT"
# fcnload "STABW"
# fcnload "MITTELWERT"
# fcnload "MINMAX"
# fcnload "freescal"
# fcnload "setdate"
# fcnload "magzoom"

# Variablen
global MAG
MAG = "10"
global ZOOM
ZOOM = "0_55"
EDITFLAG := 1
GF := 0
GFS = ""
FOL := 0
EPI := 0
ROIAREA := 0.0
BONEAREA := 0.0
BONEPERIM := 0.0
TRABEKGES := 0.0
TRABEKABS := 0.0
SUMTOT := 0.0
SUMPOS := 0.0
SUMPRO := 0.0
QUOTIENT := 0.0
TEMP := 0

# Segmentierwerte (default)
PHL = 106
PHH = 199
PLL = 91
PLH = 183
PSL = 16
PSH = 136

# ! magzoom (MAG, ZOOM)
# write "MAG", MAG, " ZOOM", ZOOM
MSload "dogi"
# Zeichenfeature: Kontur
MSsetprop "DRAWFEAT", "DRLABEL"
# Messwerte für die Regionen auswerten

```

```

# MSsetprop "FIELDFEAT","FLDAREA[UNIT^2]=SUM(AREA),FLDCOUNT[#]=SUM(1)"
# MSsetprop "FIELDFEAT","FLDPERIM[UNIT]=SUM(PERIM)"

DBsetpath "D:/Daten/DOGI"

showwindow "Messages",1
write "@"
write "DOG-I-2000"
write ""
write "Kalibriert auf MAG x 10, ZOOM x 0.55"

# kalibrieren
MByesno "Kalibrieren?"
if _STATUS == 1
    freescal
endif

# *****
# Hauptschleife (Schnitt)
# *****
while 1
    imgdelete ""
    showwindow "Messages",1
    write "@"
    write "DOG-I-2000"
    write ""
    write "Schnittname: unbedingt einen neuen"
    write "eingeben, sonst falsche Werte"
    NAME ="TEST"
    read NAME, "Schnittnamen eingeben (8 ZEICHEN) :"
    STATISTIK = NAME + ".DOG"

# Datenbank-Definitionen
DBnew STATISTIK,8
DBsetcolumn STATISTIK,1,"Schnitt",20,"<none>"
DBsetcolumn STATISTIK,2,"Messung",16,"<none>"
DBsetcolumn STATISTIK,3,"AreaTotal","Float","[µm²]"
DBsetcolumn STATISTIK,4,"AreaBone","Float","[µm²]"
DBsetcolumn STATISTIK,5,"Quotient","Float","[%]"
DBsetcolumn STATISTIK,6,"Perimeter","Float","[µm]"
DBsetcolumn STATISTIK,7,"Trabekelx40","Float","[µm]"
DBsetcolumn STATISTIK,8,"Trabekelabs","Float","[µm]"
datalist STATISTIK,0,0
update

# *****
# KNOCHEN messen
# *****
GF = 0
# SUMTOT := 0.0
# SUMPOS := 0.0
# SUMPROZENT := 0.0
while 1
    GF = GF + 1
    CTR = GF
    GFS = string(GF)
    imgdelete "WORKPIC"
    DELETETMP
    Gclear 0
    showwindow "Display"
    write "@"
    write "BILD EINSTELLEN"
    write "(dann <OK> drücken) "
    write "-----"
    write "Messung (GF) : ",GF
    beep 200,400
    ! tvinput "WORKPIC"
    imgdisplay "WORKPIC"
    imgcopy "WORKPIC","LAST"
    if GF == 1
        imgcopy "WORKPIC","FIRST"
    endif
    showwindow "Messages",1
    Gclear 0
    beep 100,220
    write "@"

```

```

write "MESSZONE WÄHLEN (ROI)"
write "-----"
write "Gewünschten Bereich mit"
write "hellgrüner Farbe umrunden"
write "zum Schluß <X> anklicken"
Gclear 0
imgcopy "WORKPIC",1
imgedit 1
Gmerge 10,255
disleighb 10,11,1,0,0,86,127,255,0,255,12,"RGB"
binfill 11,"ROIAREA"
Gclear 0
imgdisplay "WORKPIC"
DELETETMP

# ROI messen (ROIAREA)
MSsetprop "FIELDFEAT","FLDAREA[UNIT^2]=SUM(AREA),FLDCOUNT[#]=SUM(1)"
MSmeasmask "ROIAREA",1,20,0,2,10
DBgetvalue 20,"FLDAREA",ROIAREA

disleighb "WORKPIC","MASK",1,0,PHL,PHH,PLL,PLH,PSL,PSH,10,"HLS"
binand "MASK","ROIAREA","MASK"
imgdisplay "WORKPIC"
MSdrawmask "MASK","WORKPIC"
MByesno "Knochenanfärbung OK?"
if _STATUS == 0
while 1
beep 100,220
beep 100,440
Gclear 0
write "@"
write "SEGMENTIEREN:"
write "-----"
write "Rechte Maustaste -> Big Display. "
write "Grenzen ändern bis Kanäle gleichmässig grün sind."
write "Zum Schluß <OK>"
# ! dislev "WORKPIC",2,LSEG,HSEG,1
! disleighb "WORKPIC","MASK",1,0,PHL,PHH,PLL,PLH,PSL,PSH,10,"HLS"
imgdisplay "WORKPIC"
Gclear 0
# mit Hintergrundmaske vergleichen
binand "MASK","ROIAREA","MASK"
imgdisplay "WORKPIC"
MSdrawmask "MASK","WORKPIC"
MByesno "Knochenanfärbung OK?"
if _STATUS == 1 : break
endwhile
endif

# Interaktives Korrigieren
MByesno "Korrigieren?"
if _STATUS == 1
EDIT (1,1,"WORKPIC","MASK")
endif

# Messen der angefärbten Fläche
MSsetprop "FIELDFEAT","FLDAREA[UNIT^2]=SUM(AREA),FLDCOUNT[#]=SUM(1)"
MSmeasmask "MASK","WORKPIC",30,0,2,10
DBgetvalue 30,"FLDAREA",BONEAREA
QUOTIENT = (BONEAREA / ROIAREA) * 100

# Messen des Umfangs (Perimeter)
# MSsetprop "FIELDFEAT","FLDPERIM[UNIT]=PERIM"
MSsetprop "FIELDFEAT","FLDPERIM[UNIT]=SUM(PERIM)"
MSmeasmask "MASK","WORKPIC",40,0,2,10
DBgetvalue 40,"FLDPERIM",BONEPERIM

# Messen der Trabekeldicke
pause "Messen der Trabekeldicke"
MSsetprop "POINTFEAT","DISTANCE"
MSmeaspoint 1,"HC",1,10,1,1,2,1,1
datahisto "HC","HC"
datalist "HC"
TRABEKGES = 0
TRABEKABS = 0
DBfirstline "HC"

```

```

while 1
  DBgetvalue "HC","DISTANCE", TEMP
  TRABEKGES = TRABEKGES + TEMP
  DBnextline "HC"
  if _STATUS == 0: break
endwhile
TRABEKABS = (TRABEKGES / 40)
swrite S_TRABEKGES, "$/4.5F", TRABEKGES
swrite S_TRABEKABS, "$/4.5F", TRABEKABS
write "Trabekelx40", S_TRABEKGES, " µm = ", S_TRABEKABS, " µm"
DBdelete "HC"

# Statistik und Speichern
DBaddline STATISTIK
swrite S_BONEAREA, "$/4.5F", BONEAREA
swrite S_ROIAREA, "$/4.5F", ROIAREA
swrite S_QUOTIENT, "$/4.5F", QUOTIENT
swrite S_BONEPERIM, "$/4.5F", BONEPERIM
DBsetvalue STATISTIK,"Schnitt",STATISTIK
DBsetvalue STATISTIK,"Messung",GFS
DBsetvalue STATISTIK,"AreaTotal",ROIAREA
DBsetvalue STATISTIK,"AreaBone",BONEAREA
DBsetvalue STATISTIK,"Quotient", QUOTIENT
DBsetvalue STATISTIK,"Perimeter", BONEPERIM
DBsetvalue STATISTIK,"Trabekelx40", TRABEKGES
DBsetvalue STATISTIK,"Trabekelabs", TRABEKABS
datalist STATISTIK,0,0
# SUMPOS := SUMPOS + AREAPOS

write "@"
write "MESSERGEBSNISSE: "
write "-----"
write "Schnitt: ", STATISTIK
write "Messung (Quadrant): ", GF
write "AreaTotal: ", S_ROIAREA, "mm²"
write "AreaBone: ", S_BONEAREA, "mm²"
write "Quotient: ", S_QUOTIENT, "%"
write "Perimeter: ", S_BONEPERIM, "mm"
MByesno "Weiteres Gesichtsfeld?"
if _STATUS == 0: break
endwhile
beep 100,440
beep 100,660
datalist STATISTIK,0,0
pause "Daten speichern!\nListensymbol unten anklicken\nListe mit EDIT/COPY in Excel-Tabelle einfügen",0
MByesno "Weiterer Schnitt?"
if _STATUS == 0: break
endwhile

stop

# *****
# MACROS
# *****

macro DELETETMP
  for c = 10;c <=20; c= c+1
    imgdelete c
  endfor
  update
  showwindow "GALLERY"
endmacro

macro EDIT(Schneiden=0,Zeichnen=0,PICTURE="",MASK="")
~Was^wollen^Sie^tun^?
~$logic
~$logic
if Schneiden == 1
  beep 100,110
  beep 100,110
  showwindow "Messages",1
  write "@"
  write "INTERAKTIVES KORRIGIEREN: Löschen"
  write "-----"
  write "KNOCHEN entfernen mit hellgrün"
  write "Zum Schluß <OK>"

```

```

imgcopy PICTURE,1
imgedit 1
Gmerge 10,255
disleighb 10,11,1,0,0,0,255,255,0,0,12,"RGB"
Gclear 0
binnot 11,12
binand MASK,12,MASK
MSdrawmask MASK,PICTURE
imgdisplay PICTURE
DELETETMP
endif

if Zeichnen == 1
update
beep 100,220
beep 100,220
showwindow "Messages",1
write "@"
write "INTERAKTIVES KORRIGIEREN: Einfügen"
write "-----"
write "KNOCHEN einmalen mit hellgrün"
write "Zum Schluß <OK>"
imgcopy PICTURE,1
imgedit 1
Gmerge 10,255
disleighb 10,11,1,0,0,0,255,255,0,0,12,"RGB"
Gclear 0
binor MASK,11,MASK
MSdrawmask MASK,PICTURE
imgdisplay PICTURE
endif
DELETETMP
endmacro

# *****
# MACRO STABW (S)
# Berechnet die Standardabweichung der Stichproben in VALUES[]
# mit n = CTR (beides müssen globale Variablen sein)
# *****
macro STABW (*S=0.0)
t := 0.0
u := 0.0
v := 0.0
for c=1, c <= CTR, c = c + 1
t = t + (VALUES[c] * VALUES[c])
u = u + (VALUES[c])
endfor
u = u * u
v = CTR * (CTR-1)
S = sqrt(((CTR*t)-u) / v)
endmacro

# *****
# MACRO MITTELWERT (MW)
# Berechnet den Mittelwert der Stichproben in VALUES[]
# mit n = CTR (beides müssen globale Variablen sein)
# *****
macro MITTELWERT (*MW=0.0)
t := 0.0
for c=1, c <= CTR, c = c + 1
t = t + (VALUES[c])
endfor
t = t / CTR
MW = t
endmacro

# *****
# MACRO MINMAX (*MIN = 0.0, *MAX = 0.0)
# Berechnet den Minimum und Maximum der Stichproben in VALUES[]
# mit n = CTR (beides müssen globale Variablen sein)
# *****
macro MINMAX (*MIN=0.0, *MAX = 0.0)
MIN = (VALUES[1])
MAX = (VALUES[1])
for c=2, c <= CTR, c = c + 1
if (VALUES[c] < MIN)

```

```

    MIN = (VALUES[c])
endif
if (VALUES[c] > MAX)
    MAX = (VALUES[c])
endif
endfor
endmacro

# *****
# MACRO FREESCAL
# Kalibriert bei Benutzung des Lichtkastens
# *****
macro freescal
write "@"
write "KALIBRIEREN:"
write "-----"
write "Millimeterpapier unterlegen!"
imgdelete "*"
Gclear 0
update
beep 100,880
beep 150,660
beep 100,880
beep 150,660
write "Messquadrat auf 10x10 mm anpassen"
write "Kontrolle von Einheit [mm] und Abmessungen"
write "Wenn alles OK und Ratio ca. = 1.00 <OK> drücken"
while 1
! tvinput "INPUT"
imgdisplay "INPUT"
MSsetgeom
MByesno "Kalibrierung korrekt?"
if _STATUS!=0:break
endwhile
endmacro

# *****
# MACRO setdate
# übergibt das Datum im Format TT.MM.JJJJ
# *****
macro setdate(*date="")
date = ""
if time(4) < 10 : date = date + "0"
date = date + string(time(4)) + "."
if time(5) < 10 : date = date + "0"
date = date + string(time(5)) + "."
date = date + string(time(6))
write "DATE:",date
endmacro

macro magzoom (MAG="", ZOOM="")
~Objektiv
~$group(1_6x,2_5x,5x,10x,20x,40x)
~Zoomfaktor
~$group(0_55x,0_8x,1_0x,1_1x)
# if MAG == "1_6x" : MAG = "1_6"
# if Objektiv == "2_5x" : MAG = "2_5"
# if Objektiv == "5x" : MAG = "5"
# if Objektiv == "10x" : MAG = "10"
# if Objektiv == "20x" : MAG = "20"
# if Objektiv == "40x" : MAG = "40"
# write "Objektiv= ", MAG
# if Zoom == "0_55x" : _ZOOM = "0_55"
# if Zoom == "0_8x" : _ZOOM = "0_8"
# if Zoom == "1_0x" : _ZOOM = "1_0"
# if Zoom == "1_1x" : _ZOOM = "1_1"
# write "Zoomfaktor= ", ZOOM
write "MAG", MAG, " ZOOM", ZOOM
endmacro
MSload "CAL2_5X_0_55"

# *****
# SETMAG: stellt Werte für das Objektiv
# ein bei Zoom = 1.1
# *****

```

```

macro SETMAG (MAG20=1, MAG10=0,MAG5=0,MAG2_5=0)
~OBJEKTIV
~$logic
~$logic
~$logic
~$logic

if MAG2_5 == 1
  MSsetprop "SCALEX",3.007
  MSsetprop "SCALEY",3.021
  MSsetprop "UNIT","micrometer"
  OBJEKTIV = 2.5
  AREA_GF := 4.0
endif

if MAG5 == 1
  MSsetprop "SCALEX",1.497
  MSsetprop "SCALEY",1.508
  MSsetprop "UNIT","micrometer"
  OBJEKTIV = 5.0
  AREA_GF := 0.98
endif

if MAG10 == 1
  MSsetprop "SCALEX",0.7390
  MSsetprop "SCALEY",0.7425
  MSsetprop "UNIT","micrometer"
  OBJEKTIV = 10
  AREA_GF := 0.24
endif

if MAG20 == 1
  MSsetprop "SCALEX",0.377358
  MSsetprop "SCALEY",0.377358
  MSsetprop "UNIT","micrometer"
  OBJEKTIV = 20
  AREA_GF := 0.063
endif

endmacro

```

---

## Makro zur Messung der Umfangsparameter am trabekulären Knochen

```

# *****
# DOG-I-2000 zero fix
# *****
# User: Julia Funk
# Datum: 08.12.2000
# Autor: Julia Funk/ Gert Krummrey
# Charite Berlin - Unfallchirurgie Campus Virchow
# *****
# Knochentrabekelmessung
# Fläche, Perimeter, 4 Distanzen
# *****
# - 08.12.00 division by zero fix (GK)
# *****
# Funktionen einbinden
# fcnload "DELETETMP"
# fcnload "EDIT"
# fcnload "STABW"
# fcnload "MITTELWERT"
# fcnload "MINMAX"
# fcnload "freescal"
# fcnload "setdate"
# fcnload "magzoom"

# Variablen
global MAG
MAG = "10"
global ZOOM
ZOOM = "0_55"
EDITFLAG := 1
GF := 0
GFS = ""
FOL := 0

```

```

EPI := 0
ROIAREA := 0.0
BONEAREA := 0.0
BONEPERIM := 0.0
HOLECLAST := 0.0
HOLEONLY := 0.0
OSTBLAST := 0.0
OSTONLY := 0.0
HOLECLASTQ := 0.0
HOLEONLYQ := 0.0
OSTBLASTQ := 0.0
OSTONLYQ := 0.0
SUMTOT := 0.0
SUMPOS := 0.0
SUMPRO := 0.0
QUOTIENT := 0.0
TEMP := 0

# Segmentierwerte (default)
PHL = 106
PHH = 199
PLL = 91
PLH = 183
PSL = 16
PSH = 136

# ! magzoom (MAG, ZOOM)
# write "MAG", MAG, " ZOOM", ZOOM
MSload "dogi"
# Zeichenfeature: Kontur
MSsetprop "DRAWFEAT","DRLABEL"
# Messwerte für die Regionen auswerten

# MSsetprop "FIELDFEAT","FLDAREA[UNIT^2]=SUM(AREA),FLDCOUNT[#]=SUM(1)"
# MSsetprop "FIELDFEAT","FLDPERIM[UNIT]=SUM(PERIM)"

DATAPATH = "C:/TEMP"
# DATAPATH = "D:/daten/DOG1"
DBsetpath DATAPATH

showwindow "Messages",1
write "@"
write "DOG-I-2000"
write ""
write "Kalibriert auf MAG x 10, ZOOM x 0.55"

# kalibrieren
MByesno "Kalibrieren?"
if _STATUS == 1
    freescal
endif

# *****
# Hauptschleife (Schnitt)
# *****
while 1
    imgdelete ""
    showwindow "Messages",1
    write "@"
    write "DOG-I-2000"
    write ""
    write "Schnittname: unbedingt einen neuen"
    write "eingeben, sonst falsche Werte"
    NAME ="TEST"
    read NAME, "Schnittnamen eingeben (8 ZEICHEN) :"
    STATISTIK = NAME + ".LIS"

# Datenbank-Definitionen
DBnew STATISTIK,14
DBsetcolumn STATISTIK,1,"Schnitt",20,"<none>"
DBsetcolumn STATISTIK,2,"Messung",16,"<none>"
DBsetcolumn STATISTIK,3,"AreaTotal","Float","[mm^2]"
DBsetcolumn STATISTIK,4,"AreaBone","Float","[mm^2]"
DBsetcolumn STATISTIK,5,"Quotient","Float","[%]"
DBsetcolumn STATISTIK,6,"Perimeter","Float","[mm]"
DBsetcolumn STATISTIK,7,"HoleClast","Float","[mm]"

```



```

DBsetcolumn STATISTIK,8,"HoleOnly","Float","[mm]"
DBsetcolumn STATISTIK,9,"OstBlast","Float","[mm]"
DBsetcolumn STATISTIK,10,"OstOnly","Float","[mm]"
DBsetcolumn STATISTIK,11,"HoleClastQ","Float","[%]"
DBsetcolumn STATISTIK,12,"HoleOnlyQ","Float","[%]"
DBsetcolumn STATISTIK,13,"OstBlastQ","Float","[%]"
DBsetcolumn STATISTIK,14,"OstOnlyQ","Float","[%]"
datalist STATISTIK,0,0
update

# *****
# KNOCHEN messen
# *****
GF = 0
# SUMTOT := 0.0
# SUMPOS := 0.0
# SUMPROZENT := 0.0
while 1
  GF = GF + 1
  CTR = GF
  GFS = string(GF)
  imgdelete "WORKPIC"
  DELETETMP
  Gclear 0
  showwindow "Display"
  write "@"
  write "BILD EINSTELLEN"
  write "(dann <OK> drücken) "
  write "-----"
  write "Messung (GF) : ",GF
  beep 200,400
  ! tvinput "WORKPIC"
  imgdisplay "WORKPIC"
  imgcopy "WORKPIC","LAST"
  if GF == 1
    imgcopy "WORKPIC","FIRST"
  endif
  showwindow "Messages",1
  Gclear 0
  beep 100,220
  write "@"
  write "MESSZONE WÄHLEN (ROI)"
  write "-----"
  write "Gewünschten Bereich mit"
  write "hellgrüner Farbe umrunden"
  write "zum Schluß <X> anklicken"
  Gclear 0
  imgcopy "WORKPIC",1
  imgedit 1
  Gmerge 10,255
  dislevrgb 10,11,1,0,0,86,127,255,0,255,12,"RGB"
  binfill 11,"ROIAREA"
  Gclear 0
  imgdisplay "WORKPIC"
  DELETETMP

# ROI messen (ROIAREA)
MSsetprop "FIELDPEAT","FLDAREA[UNIT^2]=SUM(AREA),FLDCOUNT[#]=SUM(1)"
MSmeasmask "ROIAREA",1,20,0,2,10
DBgetvalue 20,"FLDAREA",ROIAREA

dislevrgb "WORKPIC","MASK",1,0,PHL,PHH,PLL,PLH,PSL,PSH,10,"HLS"
binand "MASK","ROIAREA","MASK"
imgdisplay "WORKPIC"
MSdrawmask "MASK","WORKPIC"
MByesno "Knochenanfärbung OK?"
if _STATUS == 0
  while 1
    beep 100,220
    beep 100,440
    Gclear 0
    write "@"
    write "SEGMENTIEREN:"
    write "-----"
    write "Rechte Maustaste -> Big Display. "
    write "Grenzen ändern bis Kanäle gleichmässig grün sind."

```

```

write "Zum Schluß <OK>"
# ! dislev "WORKPIC",2,LSEG,HSEG,1
! dislevrgb "WORKPIC","MASK",1,0,PHL,PHH,PLL,PLH,PSL,PSH,10,"HLS"
imgdisplay "WORKPIC"
Gclear 0
# mit Hintergrundmaske vergleichen
binand "MASK","ROIAREA","MASK"
imgdisplay "WORKPIC"
MSdrawmask "MASK","WORKPIC"
MByesno "Knochenanfärbung OK?"
if _STATUS == 1 : break
endwhile
endif

# Interaktives Korrigieren
# MByesno "Korrigieren?"
# if _STATUS == 1
#   EDIT (1,1,"WORKPIC","MASK")
# endif

# Messen der angefärbten Fläche
MSsetprop "FIELDFEAT","FLDAREA[UNIT^2]=SUM(AREA),FLDCOUNT[#]=SUM(1)"
MSmeasmask "MASK","WORKPIC",30,0,2,10
DBgetvalue 30,"FLDAREA",BONEAREA
if ROIAREA == 0
  QUOTIENT = 0.0
else
  QUOTIENT = (BONEAREA / ROIAREA) * 100
endif

# Messen des Umfangs (Perimeter)
# MSsetprop "REGIONFEAT","FLDPERIM[UNIT]=PERIM"
MSsetprop "FIELDFEAT","FLDPERIM[UNIT]=SUM(PERIM)"
MSmeasmask "MASK","WORKPIC",40,0,2,10
DBgetvalue 40,"FLDPERIM",BONEPERIM

# Messen der Lakunen mit Osteoklasten
pause "Messen der Lakunen mit Osteoklasten"
MSsetprop "POINTFEAT","DISTANCE"
MSmeaspoint 1,"HC",1,10,1,1,2,1,1
datalist "HC",0,0
HOLECLAST = 0.0
HOLECLASTQ = 0.0
DBfirstline "HC"
if _STATUS
  while 1
    DBgetvalue "HC","DISTANCE", TEMP
    HOLECLAST = HOLECLAST + TEMP
    DBnextline "HC"
    if _STATUS == 0: break
  endwhile
endif
if BONEPERIM == 0
  HOLECLASTQ = 0.0
else
  HOLECLASTQ = (HOLECLAST / BONEPERIM) * 100
endif
swrite S_HOLECLAST, "$/4.5F", HOLECLAST
swrite S_HOLECLASTQ, "$/4.5F", HOLECLASTQ
write "HoleClast",S_HOLECLAST, " mm = ", S_HOLECLASTQ, " %"
DBdelete "HC"

# Messen der Lakunen ohne Osteoklasten
pause "Messen der Lakunen ohne Osteoklasten"
MSsetprop "POINTFEAT","DISTANCE"
MSmeaspoint 1,"HC",1,10,1,1,2,1,1
datalist "HC",0,0
HOLEONLY = 0.0
HOLEONLYQ = 0.0
DBfirstline "HC"
if _STATUS
  while 1
    DBgetvalue "HC","DISTANCE", TEMP
    HOLEONLY = HOLEONLY + TEMP
    DBnextline "HC"
    if _STATUS == 0: break
  endwhile
endif

```

```

endif
if BONEPERIM == 0
  HOLEONLYQ = 0.0
else
  HOLEONLYQ = (HOLEONLY / BONEPERIM) * 100
endif
swrite S_HOLEONLY, "$/4.5F", HOLEONLY
swrite S_HOLEONLYQ, "$/4.5F", HOLEONLYQ
write "HoleOnly", S_HOLEONLY, " mm = ", S_HOLEONLYQ, " %"
DBdelete "HC"

# Messen von Osteoid mit Osteoblasten
pause "Messen von Osteoid mit Osteoblasten"
MSsetprop "POINTFEAT", "DISTANCE"
MSmeaspoint 1, "HC", 1, 10, 1, 1, 2, 1, 1
datalist "HC", 0, 0
OSTBLAST = 0.0
OSTBLASTQ = 0.0
DBfirstline "HC"
if _STATUS
  while 1
    DBgetvalue "HC", "DISTANCE", TEMP
    OSTBLAST = OSTBLAST + TEMP
    DBnextline "HC"
    if _STATUS == 0: break
  endwhile
endif
if BONEPERIM == 0
  OSTBLASTQ = 0.0
else
  OSTBLASTQ = (OSTBLAST / BONEPERIM) * 100
endif
swrite S_OSTBLAST, "$/4.5F", OSTBLAST
swrite S_OSTBLASTQ, "$/4.5F", OSTBLASTQ
write "OstBlast", S_OSTBLAST, " mm = ", S_OSTBLASTQ, " %"
DBdelete "HC"

# Messen von Osteoid ohne Osteoblasten
pause "Messen von Osteoid ohne Osteoblasten"
MSsetprop "POINTFEAT", "DISTANCE"
MSmeaspoint 1, "HC", 1, 10, 1, 1, 2, 1, 1
datalist "HC", 0, 0
OSTONLY = 0.0
OSTONLYQ = 0.0
DBfirstline "HC"
if _STATUS
  while 1
    DBgetvalue "HC", "DISTANCE", TEMP
    OSTONLY = OSTONLY + TEMP
    DBnextline "HC"
    if _STATUS == 0: break
  endwhile
endif
if BONEPERIM == 0
  OSTONLYQ = 0.0
else
  OSTONLYQ = (OSTONLY / BONEPERIM) * 100
endif
swrite S_OSTONLY, "$/4.5F", OSTONLY
swrite S_OSTONLYQ, "$/4.5F", OSTONLYQ
write "HoleClast", S_HOLECLAST, " mm = ", S_HOLECLASTQ, " %"
DBdelete "HC"

# Statistik und Speichern
DBaddline STATISTIK
swrite S_BONEAREA, "$/4.5F", BONEAREA
swrite S_ROIAREA, "$/4.5F", ROIAREA
swrite S_QUOTIENT, "$/4.5F", QUOTIENT
swrite S_BONEPERIM, "$/4.5F", BONEPERIM
DBsetvalue STATISTIK, "Schnitt", STATISTIK
DBsetvalue STATISTIK, "Messung", GFS
DBsetvalue STATISTIK, "AreaTotal", ROIAREA
DBsetvalue STATISTIK, "AreaBone", BONEAREA
DBsetvalue STATISTIK, "Quotient", QUOTIENT
DBsetvalue STATISTIK, "Perimeter", BONEPERIM
DBsetvalue STATISTIK, "HoleClast", HOLECLAST

```

```

DBsetvalue STATISTIK,"HoleOnly", HOLEONLY
DBsetvalue STATISTIK,"OstBlast", OSTBLAST
DBsetvalue STATISTIK,"OstOnly", OSTONLY
DBsetvalue STATISTIK,"HoleClastQ", HOLECLASTQ
DBsetvalue STATISTIK,"HoleOnlyQ", HOLEONLYQ
DBsetvalue STATISTIK,"OstBlastQ", OSTBLASTQ
DBsetvalue STATISTIK,"OstOnlyQ", OSTONLYQ
datalist STATISTIK,0,0
# SUMPOS := SUMPOS + AREAPOS

write "@"
write "MESSERGEBSNISSE: "
write "-----"
write "Schnitt: ", STATISTIK
write "Messung (Quadrant): ", GF
write "AreaTotal: ", S_ROIAREA, "mm²"
write "AreaBone: ", S_BONEAREA, "mm²"
write "Quotient: ", S_QUOTIENT, "%"
write "Perimeter: ", S_BONEPERIM, "mm"
MByesno "Weiteres Gesichtsfeld?"
if _STATUS == 0: break
endwhile
beep 100,440
beep 100,660
datalist STATISTIK,0,0
pause "Daten speichern!\nListensymbol unten anklicken\nListe mit EDIT/COPY in Excel-Tabelle einfügen",0
MByesno "Weiterer Schnitt?"
if _STATUS == 0: break
endwhile

stop

# *****
# MACROS
# *****

macro DELETETMP
for c = 10;c <=20; c= c+1
imgdelete c
endfor
update
showwindow "GALLERY"
endmacro

macro EDIT(Schneiden=0,Zeichnen=0,PICTURE="",MASK="")
~Was^wollen^Sie^tun^?
~$logic
~$logic
if Schneiden == 1
beep 100,110
beep 100,110
showwindow "Messages",1
write "@"
write "INTERAKTIVES KORRIGIEREN: Löschen"
write "-----"
write "KNOCHEN entfernen mit hellgrün"
write "Zum Schluß <OK>"
imgcopy PICTURE,1
imgedit 1
Gmerge 10,255
dislevrgb 10,11,1,0,0,0,255,255,0,0,12,"RGB"
Gclear 0
binnot 11,12
binand MASK,12,MASK
MSdrawmask MASK,PICTURE
imgdisplay PICTURE
DELETETMP
endif

if Zeichnen == 1
update
beep 100,220
beep 100,220
showwindow "Messages",1
write "@"
write "INTERAKTIVES KORRIGIEREN: Einfügen"

```

```

write "-----"
write "KNOCHEN einmal mit hellgrün"
write "Zum Schluß <OK>"
imgcopy PICTURE,1
imgedit 1
Gmerge 10,255
dislelrgb 10,11,1,0,0,0,255,255,0,0,12,"RGB"
Gclear 0
binor MASK,11,MASK
MSdrawmask MASK,PICTURE
imgdisplay PICTURE
endif
DELETETMP
endmacro

# *****
# MACRO STABW (S)
# Berechnet die Standardabweichung der Stichproben in VALUES[]
# mit n = CTR (beides müssen globale Variablen sein)
# *****
macro STABW (*S=0.0)
t := 0.0
u := 0.0
v := 0.0
for c=1, c <= CTR, c = c + 1
t = t + (VALUES[c] * VALUES[c])
u = u + (VALUES[c])
endfor
u = u * u
v = CTR * (CTR-1)
S = sqrt(((CTR*t)-u) / v)
endmacro

# *****
# MACRO MITTELWERT (MW)
# Berechnet den Mittelwert der Stichproben in VALUES[]
# mit n = CTR (beides müssen globale Variablen sein)
# *****
macro MITTELWERT(*MW=0.0)
t := 0.0
for c=1, c <= CTR, c = c + 1
t = t + (VALUES[c])
endfor
t = t / CTR
MW = t
endmacro

# *****
# MACRO MINMAX (*MIN = 0.0, *MAX = 0.0)
# Berechnet den Minimum und Maximum der Stichproben in VALUES[]
# mit n = CTR (beides müssen globale Variablen sein)
# *****
macro MINMAX(*MIN=0.0, *MAX = 0.0)
MIN = (VALUES[1])
MAX = (VALUES[1])
for c=2, c <= CTR, c = c + 1
if (VALUES[c] < MIN)
MIN = (VALUES[c])
endif
if (VALUES[c] > MAX)
MAX = (VALUES[c])
endif
endfor
endmacro

# *****
# MACRO FREESCAL
# Kalibriert bei Benutzung des Lichtkastens
# *****
macro freescal
write "@"
write "KALIBRIEREN:"
write "-----"
write "Millimeterpapier unterlegen!"
imgdelete ""

```

```

Gclear 0
update
beep 100,880
beep 150,660
beep 100,880
beep 150,660
write "Messquadrat auf 10x10 mm anpassen"
write "Kontrolle von Einheit [mm] und Abmessungen"
write "Wenn alles OK und Ratio ca. = 1.00 <OK> drücken"
while 1
  ! tinput "INPUT"
  imgdisplay "INPUT"
  MSsetgeom
  MByesno "Kalibrierung korrekt?"
  if _STATUS!=0:break
endwhile
endmacro

# *****
# MACRO setdate
# übergibt das Datum im Format TT.MM.JJJJ
# *****
macro setdate(*date="")
  date = ""
  if time(4) < 10 : date = date + "0"
  date = date + string(time(4)) + "."
  if time(5) < 10 : date = date + "0"
  date = date + string(time(5)) + "."
  date = date + string(time(6))
  write "DATE:",date
endmacro

macro magzoom (MAG="", ZOOM="")
~Objektiv
~$group(1_6x,2_5x,5x,10x,20x,40x)
~Zoomfaktor
~$group(0_55x,0_8x,1_0x,1_1x)
# if MAG == "1_6x" : MAG = "1_6"
# if Objektiv == "2_5x" : MAG = "2_5"
# if Objektiv == "5x" : MAG = "5"
# if Objektiv == "10x" : MAG = "10"
# if Objektiv == "20x" : MAG = "20"
# if Objektiv == "40x" : MAG = "40"
# write "Objektiv= ", MAG
# if Zoom == "0_55x" : _ZOOM = "0_55"
# if Zoom == "0_8x" : _ZOOM = "0_8"
# if Zoom == "1_0x" : _ZOOM = "1_0"
# if Zoom == "1_1x" : _ZOOM = "1_1"
# write "Zoomfaktor= ", ZOOM
write "MAG", MAG, " ZOOM", ZOOM
endmacro
MSload "CAL2_5X_0_55"

# *****
# SETMAG: stellt Werte für das Objektiv
# ein bei Zoom = 1.1
# *****
macro SETMAG (MAG20=1, MAG10=0,MAG5=0,MAG2_5=0)
~OBJEKTIV
~$logic
~$logic
~$logic
~$logic

if MAG2_5 == 1
  MSsetprop "SCALEX",3.007
  MSsetprop "SCALEY",3.021
  MSsetprop "UNIT","micrometer"
  OBJEKTIV = 2.5
  AREA_GF := 4.0
endif

if MAG5 == 1
  MSsetprop "SCALEX",1.497
  MSsetprop "SCALEY",1.508
  MSsetprop "UNIT","micrometer"

```

```

    OBJEKTIV = 5.0
    AREA_GF := 0.98
endif
if MAG10 == 1
    MSsetprop "SCALEX",0.7390
    MSsetprop "SCALEY",0.7425
    MSsetprop "UNIT","micrometer"
    OBJEKTIV = 10
    AREA_GF := 0.24
endif
if MAG20 == 1
    MSsetprop "SCALEX",0.377358
    MSsetprop "SCALEY",0.377358
    MSsetprop "UNIT","micrometer"
    OBJEKTIV = 20
    AREA_GF := 0.063
endif
endmacro

```

---

## Makro zur Messung der MAR an kortikalen Osteonen

```

#-----
# MACRO: BONE_FL_Meas_B04.MCR
# KEYWORDS: Field-measurement/Object-Measurement of Bone-Regions
# ABSTRACT: Field measurement / Object measurement
# SYSTEM: KS400 - rel 3.0
# OPTIONS: Color
# IMAGES: FL_Red.TIF, FL_Green.TIF, FL_Blue.TIF
# AUTHORS: J.Funk/T. Betz
# HISTORY: 11.6.99
# *****
# Universal-Version with Macro-Tools
MByesno "Are you familiar with the operation of the TV-Camera in Long Exposure Mode?"
if _STATUS=0
    beep 100,1000
    pause "Read the Quickstart-manual for the camera MC3254 and RemoteControlUnit RM-C950 !",0
endif
# MBok "The Trigger-Input Control is realised inside the macro! You must only use the LONG EXOSURE Buttons on the RM-C950
!!!"

# Loading the external macros
fcnload "Obj_lei.mcr"
fcnload "Zoom_lei.mcr"
fcnload "Scal_sel.mcr"
fcnload "start_ini.mcr"
fcnload "dbpath.mcr"
fcnload "var_b04.mcr"
fcnload "db_b04.mcr"
# fcnload "freescal.mcr"

# Initialization
start_ini
# Datapath
dbpath
# Application specific Variables for the database and measurement
var_b04

# runtime Variables
dbold =0
_weiter=1
_correct=1

# Check for working on with existing (old) database
MByesno "Go on with existing database?"
dbold = _STATUS
if dbold == 1
    !datalist
    _DATABASE=DataBase
    APPEND=0
else
    db_b04
    datalist _DATABASE
endif

```

```

# Initializing the parameters
MSload "default"
# MSsetprop "UNIT","millimeter"

# Scaling functions
showwindow "Messages",1
beep 100,880
beep 150,660
write "Selection of optical input"
!Scal_sel
if _Sel==1
  # Selection of Objective and Zoomfactor
  beep 100,1000
  MBok "Select the used Objective and Zoomfactor!"
  !Obj
  !Zoom
  # Load the right MS-File
  MFile=_MObj+" "+_MZoom
  write "Ms-File= ",MFile
  MSload MFile
endif
if _Sel==0
  freescal
endif

# Measurement features

MSsetprop "REGIONFEAT","CGRAVX,CGRAVY,FERETMAX,AREA"
MSsetprop "FIELDFEAT","Flaeche[UNIT^2]=SUM(AREA)"
MSsetprop "DRAWFEAT","DRCONTOUR"

# Measurement Loop
# *****
# Main_loop
while 1
  DBaddline _DATABASE
  read _PRO_NR,"Enter the project number: \n KEEP SYNTAX !"
  DBsetvalue _DATABASE,"Project_Nr",_PRO_NR
  read _PAT_NR,"Enter the patient number: \n KEEP SYNTAX !"
  DBsetvalue _DATABASE,"Patient_Nr",_PAT_NR
  read _SLIDE_NR,"Enter the slide number: \n KEEP SYNTAX !"
  DBsetvalue _DATABASE,"Slide_Nr",_SLIDE_NR
  read _LOCAL,"Enter the localisation: \n KEEP SYNTAX !"
  DBsetvalue _DATABASE,"Localisation",_LOCAL
# Secondary Loop
while 1
  DBaddline _DATABASE
  _MEAS_NR=_MEAS_NR+1
  DBsetvalue _DATABASE,"Meas_Nr",_MEAS_NR
  write "@"
  imgdelete "*"
  Gclear 0
  update
  imgnew "INP_CUTR",760,572,1,"Colour"
  imgnew "INP_CUTG",760,572,1,"Colour"
  imgnew "INP_CUTB",760,572,1,"Colour"
  beep 100,880
  beep 150,660
  pause "Position the next image RED-Fluoreszenz (Xylenolorange)!",2000
  # Demomode
  # !imgload "fl_red.tif","INPUTR"
  # Live-Mode
  !tvinput "INPUTR"
  imgdisplay "INPUTR"
  wincopy "INPUTR","INP_CUTR",6,3,760,572,0,0
  imgdisplay "INP_CUTR"
  beep 100,880
  beep 150,660
  pause "Position the next image GREEN-Fluoreszenz (Calcein green)!",2000
  # Demomode
  # !imgload "fl_green.tif","INPUTG"
  # Live-Mode
  !tvinput "INPUTG"
  imgdisplay "INPUTG"
  wincopy "INPUTG","INP_CUTG",6,3,760,572,0,0

```



```

imgdisplay "INP_CUTG"
beep 100,880
beep 150,660
pause "Position the next image BLUE-Fluoreszenz (Tetracylin)!",2000
# Demomode
# !imgload "fl_blue.tif","INPUTB"
# Live-Mode
! tinput "INPUTB"
imgdisplay "INPUTB"
wincopy "INPUTB","INP_CUTB",6,3,760,572,0,0
imgdisplay "INP_CUTB"
# Enhancement
normalize "INP_CUTR","ENH_NORMR",9
imgdisplay "ENH_NORMR"
normalize "INP_CUTG","ENH_NORMG",95
imgdisplay "ENH_NORMG"
normalize "INP_CUTB","ENH_NORMB",999
imgdisplay "ENH_NORMB"
# Combine
combine "ENH_NORMR","ENH_NORMG","COMB_RG",0.75,0.75,0
combine "COMB_RG","ENH_NORMB","COMB_RGB",0.75,0.30,0
# Segmentation
# Green
MBok "Open the Input Image (left thumbnail) and click in the green ring!"
! reggrow "COMB_RGB[1,2]",10,2,1,1,420,111,100,200,10
MByesno "Do you need the correction of the ring?"
if _STATUS==1
MBok "Close the ring with pencil in yellow and size 6!"
imgedit 10
Gmerge 10,255
Gclear 0
endif
binfill 10,"FILL_G"
binclose "FILL_G","CLOSE_G",5,1
# Blue
MBok "Open the Input Image (left thumbnail) and click in the blue ring!"
! reggrow "COMB_RGB[1,1]",11,2,1,1,426,232,100,200,10
MByesno "Do you need the correction of the ring?"
if _STATUS==1
MBok "Close the ring with pencil in yellow and size 6!"
imgedit 11
Gmerge 11,255
Gclear 0
endif
binfill 11,"FILL_B"
binclose "FILL_B","CLOSE_B",5,1
# Red
MBok "Open the Input Image (left thumbnail) and click in the red ring!"
! reggrow "INPUTR[1,1]",12,2,1,1,361,336,100,200,5
MByesno "Do you need the correction of the ring?"
if _STATUS==1
MBok "Close the ring with pencil in yellow and size 6!"
imgedit 12
Gmerge 12,255
Gclear 0
endif
binfill 12,"FILL_R"
binclose "FILL_R","CLOSE_R",5,1

#-----
# get center gravity of the bone
#-----
MSsetprop "SCALEX",1
MSsetprop "SCALEY",1
MSsetprop "UNIT","pixel"

RGnew "CLOSE_G","COMB_RGB"
RGfirstregion
MSmeasregion 1
MSgetvalue "CGRAVX",cx
MSgetvalue "CGRAVY",cy
RGdelete

#-----
# prepare measurement mask image
#-----

```

```

a := 0.0
for a = 0.0, a <= _PI, a = a + _PI / 36
  x1 = int(cx + cos(a) * 300)
  y1 = int(cy + sin(a) * 300)
  x2 = int(cx - cos(a) * 300)
  y2 = int(cy - sin(a) * 300)
  Gvector x1,y1,x2,y2,14
endfor
Gflush
imgnew "MASK",760,572,1,"Grey"
Gmerge "MASK",255
Gclear 0

# load the calibrated measurement features
MSload MFile
MSsetprop "REGIONFEAT","CGRAVX,CGRAVY,FERETMAX,AREA"
MSsetprop "FIELDFEAT","MEAN_FERET[UNIT]=MEAN(FERETMAX)"

# Messung
binxor "CLOSE_G","CLOSE_B","AREA_BG"
MSmeasmask "AREA_BG","COMB_RGB","AREA_BG",0,1,10
imgdisplay "AREA_BG"
wait 1000
DBgetvalue "AREA_BG","AREA",AREA_BG
DBsetvalue _DATABASE,"Area_BG",AREA_BG
binxor "CLOSE_B","CLOSE_R","AREA_RB"
imgdisplay "AREA_RB"
wait 1000
MSmeasmask "AREA_RB","COMB_RGB","AREA_RB",0,1,10
DBgetvalue "AREA_RB","AREA",AREA_RB
DBsetvalue _DATABASE,"Area_RB",AREA_RB
binmask "AREA_RB","MASK","DIST_RB"
imgdisplay "DIST_RB"
wait 1000
MSmeasmask "DIST_RB","COMB_RGB","MFERET",0,2,10
DBgetvalue "MFERET","MEAN_FERET",M_DIST_RB
DBsetvalue _DATABASE,"M_Dist_RB",M_DIST_RB
binmask "AREA_BG","MASK","DIST_BG"
imgdisplay "DIST_BG"
wait 1000
MSmeasmask "DIST_BG","COMB_RGB","MFERET",0,2,10
DBgetvalue "MFERET","MEAN_FERET",M_DIST_BG
DBsetvalue _DATABASE,"M_Dist_BG",M_DIST_BG
binxor "CLOSE_G","CLOSE_R","AREA_RG"
imgdisplay "AREA_RG"
binmask "AREA_RG","MASK","DIST_RG"
imgdisplay "DIST_RG"
wait 1000
MSmeasmask "DIST_RG","COMB_RGB","MFERET",0,2,10
DBgetvalue "MFERET","MEAN_FERET",M_DIST_RG
DBsetvalue _DATABASE,"M_Dist_RG",M_DIST_RG

  MByesno "Are you going to measure another slide?"
  if _STATUS!=1:break
endwhile

beep 100,880
beep 200,990
showwindow "Messages",1
write "@"
write "The program is finished"
write "Save your data list in an excel file"
wait 2000

stop
# don't forget the stop command over this line !!!!!!!!!!!!!!!
# external macros
# -----
macro Obj_lei (Objektiv="1_6x")
~Objektiv
~$group(1_6x,2_5x,5x,10x,20x,40x)
# Mobj:=""
if Objektiv == "1_6x" : _MObj = "1_6x"
if Objektiv == "2_5x" : _MObj = "2_5x"
if Objektiv == "5x" : _MObj = "5x"
if Objektiv == "10x" : _MObj = "10x"

```

```

    if Objektiv == "20x" : _MObj = "20x"
    if Objektiv == "40x" : _MObj = "40x"
write "Objektiv= ", Objektiv
endmacro

```

```

macro Zoom_lei (Zoom="0_55x")
~Zoomfaktor
~$group(0_55x,0_8x,1_0x,1_1x)
# MZoom:=""
    if Zoom == "0_55x" : _MZoom = "0_55"
    if Zoom == "0_8x" : _MZoom = "0_8"
    if Zoom == "1_0x" : _MZoom = "1_0"
    if Zoom == "1_1x" : _MZoom = "1_1"
write "Zoomfaktor= ", Zoom
endmacro

```

```

macro Scal_sel (Sel="Microscope")
~Zoomfaktor
~$group(Microscope,Macroscope)
# MZoom:=""
    if Sel == "Microscope" : _Sel = 1
    if Sel == "Macroscope" : _Sel = 0
write "Selection for Scaling is: ", Sel
endmacro

```

```

macro start_ini
imgdelete "*"
Gclear 0
MSload "default"
update
write "@"
showwindow "Display",1
showwindow "Gallery",1
showwindow "Messages",1
endmacro

```

```

macro dbpath
# _DATAPATH:="C:/daten"
_DATAPATH:="D:/daten/bone"
while 1
beep 100,1100
beep 100, 990
read _DATAPATH,"Enter the Database-Path: \n KEEP SYNTAX !"
    if fexist (_DATAPATH) != 2
        beep 300,440
        beep 300,440
        MBok "The path >> " + _DATAPATH + " << doesn't exist. Enter the correct exisiting path!"
    else
        break
    endif
endwhile
DBsetpath _DATAPATH
endmacro

```

## Danksagung

Allen, die mich während der Zeit meiner Promotion unterstützt haben, gilt mein herzlicher Dank.

In erster Linie möchte ich mich bei dem Direktor des Zentrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Herrn Prof. Dr. med. N. P. Haas bedanken, in dessen Institution ich meine wissenschaftliche Arbeit durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt dem ehemaligen leitenden Oberarzt dieser Abteilung, Herrn PD Dr. med. M. J. Raschke, für die Überlassung des interessanten Themas meiner Dissertation und die tatkräftige Unterstützung, die er mir als Doktorvater jederzeit gewährte. Nach seiner Berufung an die Universität Münster übernahm dankenswerter Weise Herr PD Dr. med. C. Perka die Aufgabe des Doktorvaters. Ihm sei insbesondere gedankt für die zügige Korrektur dieses Manuskripts.

Auch Herrn Prof. Dr. H. Plenk, Leiter des Histologisch-Embryologischen Instituts der Universität Wien, möchte ich danken für die Schulung meines histologischen Blicks sowie die wichtigen Hinweise aus seiner langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der Knochenhistologie bezüglich einer sinngerechten Auswertung meiner Präparate.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer, Oberarzt in der obengenannten Abteilung, Herrn Dr. med. H. J. Bail, für die Anleitung zur wissenschaftlichen Bearbeitung des Themas, die kritischen Anmerkungen und fruchtbaren Diskussionen während des praktischen Teils und bei der Durchsicht des Manuskripts.

Gabriele Hardung und Marzena Princ möchte ich ganz besonders danken für die qualifizierte Einführung in die histologische Bearbeitung von Knochen. Ohne ihre theoretischen und praktischen Tipps und nicht zuletzt den immer frischen Kaffee und endorphinfreisetzende Schokolade wäre mein Elan bei der histologischen Laborarbeit sicherlich nicht so ausgeprägt gewesen.

Für die Einführung in das Bildanalysesystem und die tatkräftige Hilfe bei der Erstellung der Makros, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben, möchte ich Herrn T. Betz und Herrn G. Krummrey danken.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei allen Mitdoktoranden bedanken, ohne die das Projekt nicht durchführbar gewesen wäre und die dazu beigetragen haben, durch Teamgeist und Freude an der gemeinsamen wissenschaftlichen Arbeit auch die weniger erbaulichen Abschnitte dieser experimentellen Untersuchung zu einem angenehmen und erfolgreichen Erlebnis zu machen. Dabei muss ich einen ganz

speziellen Dank an Fr. Dr. med. vet. Petra Seebeck geborene Klein richten, die mich nicht nur ständig mit guten Ideen zum Weiterarbeiten anspornte und durch erfrischende Kommunikation auch lange Tage im Labor kurzweilig machte sondern auch mit konstruktiver Kritik dafür sorgte, mein Manuskript zu dem hier vorliegenden werden zu lassen.

Auch die Angestellten der Tierversuchsabteilung seien nicht vergessen und mit einem Dank für ihre Arbeit bedacht.

Meinen Eltern gilt ein ganz herzliches Dankeschön für die unermüdliche mentale, kulinarische und auch finanzielle Unterstützung, die fachkundige Anleitung zur Literaturrecherche und statistischen Datenverarbeitung und insbesondere natürlich auch für die Geduld und das Vertrauen, die sie mir nicht nur bei der Bewerkstelligung dieser Aufgabe entgegenbrachten.

Auch meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle danken, dass sie immer bereit waren, die Probleme, die mir auf der Seele lagen, bei Speis und Trank zu erörtern, mich jedoch auch daran zu erinnern, dass man nicht über Nacht im Schlaf promoviert, und mich nicht vergessen zu lassen, dass die Welt sich außerhalb des Labors noch dreht.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Funk  
Vorname: Julia Franziska  
Geburtsdatum: 18. Januar 1974  
Geburtsort: Berlin  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

Grundschule: 1980-1984 Waldschule, Berlin  
1984-1986 Dietrich-BonhoefferGrundschule, Berlin  
Gymnasium: 1986-1993 Erich-Hoepner-Oberschule, Berlin  
High-School: 1990/1991 Penn-Trafford-High-School, Harrison City, PA, USA

Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am 26.05.1993

### Studium

WS 1993-WS 1995 Humanmedizin, Freie Universität Berlin  
SS 1996-WS 2000 Humanmedizin, Humboldt-Universität Berlin

Ärztliche Prüfung am 14.11.2000

### Praktisches Jahr

10/1999-02/2000 Innere Medizin (St. Mary's Hospital, Newport, Isle of Wight, GB  
Schlosspark-Klinik, Berlin)  
02/2000-06/2000 Orthopädie (Oskar-Helene-Heim, Berlin)  
06/2000-09/2000 Chirurgie (Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin)

### Berufsausbildung

09/2001-02/2003 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Orthopädie der Charité, Berlin  
seit 01.03.2003 Assistenzärztin in der Klinik für Orthopädie der Charité, Berlin

## **Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Ich versichere, keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Literaturstellen benutzt zu haben.

Berlin den 01.04.2004

Julia Funk